

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

**Implicación de los agentes
vasoactivos, Endotelina-1 y
Angiotensina II, y de la
citoquina profibrótica TGF- β
en la génesis de la lesión
vascular.**

Juan Rodríguez Vita

Madrid, 2007

**Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid**

**Implicación de los agentes
vasoactivos, Endotelina-1 y
Angiotensina II, y de la citoquina
profibrótica TGF- β en la génesis de la
lesión vascular.**

TESIS DOCTORAL

Juan Rodríguez Vita

Licenciado en Ciencias Biológicas

**Directores: Marta Ruíz-Ortega y Jesús Egido de los Ríos
Laboratorio de Nefrología Experimental y Patología Vascular
Fundación Jiménez Díaz**

Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Doña Marta Ruíz-Ortega, Doctora en Ciencias Químicas,

CERTIFICAN

Que Don Juan Rodríguez Vita, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Implicación de los agentes vasoactivos, Endotelina-1 y Angiotensina II, y de la citoquina profibrótica TGF- β en la génesis de la lesión vascular." que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 25 de Mayo de 2007

Dr. Jesús Egido de los Ríos

Dra. Marta Ruíz-Ortega

"Lo que nos vuelve locos no es dudar sino estar convencidos de algo."
Friedrich Nietzsche.

A mis padres.
A Ara.

Agradecimientos

Espero que en este apartado cometa menos errores que en el resto de paginas que le seguirán porque quizá sea la parte más importante de toda la tesis, sin la gente que aparece en este apartado no habría sido posible.

Debo empezar dando las gracias al Dr. Egido, ya que sin su dirección y su esfuerzo por hacer de este laboratorio lo que es, nunca habría llegado tan lejos. Gracias a Marta por tener la paciencia de enseñarme a ser un investigador, siempre le deberé una a María por avisarme de que buscabas becario. Me gustaría continuar por Van, la pumukinki, no tengo paginas suficientes para decirte todo lo que te tengo que agradecer, primero fuiste una compañera, pero rápidamente pasaste a ser una de mis mejores amigas. Gracias, tú me has enseñado el tipo de persona que quiero ser. Espero que algún día nuestros caminos laborales se vuelvan a cruzar. Elsa espero que para ti el ser mi compañera haya sido tan bueno como para mí, recuerda que tú vales un huevo, ¿te acuerdas? Espero que no se te haga muy cuesta arriba lo que te queda para estar escribiendo esto, cuenta conmigo para lo que necesites. Alfi, que el labo no es lo mismo desde que no estas, ya nadie tose. Me alegro de que todo te vaya tan bien o debería decir, "so fine". Gracias por ser un apoyo tan grande. Julio, el futuro jefazo del Marañón, a ver si no se te escapan esos cardiomiocitos. Gracias por enseñarme tanto, ¡a ver si nos comemos un día de estos unas buenas lentejas con chorizo! Cris, espero que lo haga la mitad de bien que tú. Ha sido una suerte poder contar con una amiga como tú desde el primer día de esta tesis, gracias por ser mi amiga. Eva, espero que para ti haya estado igual de bien que para mí haber colaborado un poco, ha sido muy fácil, espero que la tuya no se haga esperar demasiado. Beita, a ver cuando te compras un camión y nos damos una vuelta. Espero que no me toques el pelo por haber escrito esto. Gracias por enseñarme a levantar el labio. Hazme un favor, no cambies nunca, eres una de las personas que más falta hace que existan. Avo, compañero, menudo cambio de Van a ti. La verdad es que no me quejo, ha sido medio añito cojonudo, me lo he pasado genial, espero estar cerca de ti mucho tiempo porque el día que triunfes, como estoy seguro de que lo vas a hacer, igual me salpica algo. A3, aunque ya te has quedado en A, ¿te acuerdas el día que entraste? Yo me dije: "¡qué tío más raro! Pero debe de ser que me gustan las cosas raras, porque no me gustaría perderte de vista. Vir, mi esquizofrénica favorita, otra de con la que no me valen las primeras impresiones, lo que te costó darte a conocer, pero como me alegro de haberte conocido, cuidado que cuando menos te lo esperes te haré cosquillas. A su excelencia Don Carlos I de la funda y V de Inmuno no tendría sitio para darle las gracias por todo lo que me ha ayudado. Eres una enciclopedia andante, que genial ha sido tenerte cerca. Menudo amigo que me ha tocado. Concha, ¡vaya añito que has pasado, eh! Espero haber podido ayudar a que se te hiciese menos duro. Ya me irás contando porque seguro que en el futuro te va genial. ¡Bego, cuánto tiempo ha pasado desde los cursos! La verdad es que nos lo pasamos bien arreglando el mundo. Ana, que poco te queda, por un momento pensé que me adelantabas. No te agobies mucho que seguro que te sale una tesis enorme. Luis, el Zar, que pena que ahora se haya puesto de moda lo del fútbol porque la verdad es que verte las piernas de leche que tienes era bastante gracioso. Gracias por todas las manos que me has echado. Pepelu, gracias por liberarnos del jefe en tantas ocasiones, sin ti nos habría tocado a todos. ¡Un abraaazooo! Oscar, ¡que te has hecho escocés! A ver cuando vuelves para que nos echemos un basket. Juan, el cordobés, ¡madre mía que viento de aire fresco que entró contigo! Norte y sur unidos para siempre. Giselle, espero que el desafío que se te presenta se te de tan bien como los dos años que has estado aguantándonos. Gracias por la botellita, la abriré cuando por fin me libre de esto. Mucha suerte. Cecile, bientôt mon ami! A ver si nos vemos pronto por Paris. Suerte con tu nueva vida porque te lo mereces. Rosario, que sigas cumpliendo muchos años trabajando aquí, bueno que sean los justos y necesarios que tampoco hay que trabajar más de la cuenta. Lupe, que no me hagas un gorro que no hace falta. Espero que hayan quedado atrás todos los malos recuerdos. A ver si me cuidas a Cecile cuando vayas para allí. Rox, ¡te vas a perder mi tesis, tía! Por lo menos me han contado que está mereciendo la pena. ¿Has conocido algún famoso? A ver si nos tomamos unas cañitas. Beñat, el comeikaikus, ¡el mejor yogur de España! Vaya lapsus, ¡eh! Me alegro de haberte conocido porque eres un tío que merece la pena. Ezkerrik asko nire laguna izangaitik. Rakel, compañera, no te preocupes que no te vas a quedar sola, al menos a corto plazo. A ver si tienes la misma suerte que yo por haber entrado donde has entrado. Sandra, que me alegro un huevo de que hayas entrado, a ver si no soy demasiado pesado enseñándote cosas. Carmen, menudo gusto musical que tienes, me tienes que pasar lo de Silvio. Parece mentira que coincidamos en

tantos grupos. Gracias por tus consejos. Sebas, gracias por quitarme algún que otro marrón de informática. Loli, gracias por tu salero andaluz. Melany, I am glad you came here, although it is only for some months. It has been really nice to meet you. I hope to visit you when you come back home. Paloma, gracias por organizar un poco todo esto, la verdad es que nos has quitado bastantes marrones.

A los de reuma, como Mari que también compartió largos ratos los cursos. A Miriam, que espero que hayas recuperado la ilusión, pero que si no es aquí que sea en cualquier sitio. A Mr. Proper, que tiene un brillante futuro por delante.

A los que se han ido definitivamente, como Jesús, al que sé que le habría hecho ilusión esta tesis. Al Dr. De Oya que ha presidido tantos tribunales de tesis y que me habría encantado que presidiese el mío.

A los que se han ido pero sólo del labo. Willy, ¡maldita sea! Que estuviste en el labo lo justo para que te echase un huevo de menos cuando te fuiste. Que sepas que aunque seas de los malos aquí tienes un amigo para siempre. Puri, ¿te acuerdas de lo que te alegraste cuando creí que eras predoc? Me alegro de que te vaya tan bien, te lo mereces. Albertito, al que también echo mucho de menos. Al menos le veo de vez en cuando tomando café. A ver cuando nos vamos de vacas a tu casa en Asturias. Rupi, que mucho de lo que aquí presento lo empecé contigo, así que te lo debo. Almu, espero que hayas tenido suerte con las endoteliales, yo la tuve teniéndote de compañera. Pilar, no tuve mucho tiempo para conocerte bien, pero lo poco que sé es que me arrepiento de no haberlo hecho porque eres una de las que merece la pena conocer.

A Vero a la que espero que todo lo vaya tan bien como colonizando Catán. Menudas partiditas que nos hemos echado. A ver si por fin un día hacemos lo del mega-mapa. A Felix que siempre tiene algo contra lo que luchar lo cual hace que tenga bien claro quienes son sus amigos.

Ahora vamos a los que me han tenido que aguantar sin que su trabajo se lo obligase. David, aunque tu compartes penurias fundacionales, eres mucho más un amigo que un compañero. De hecho en ocasiones hemos estado casi como pareja, ¿te acuerdas de la casa de mi hermano? Gracias por estar allí cuando lo he necesitado. Guille, ¡que poco te queda! Y tú que querías hacer chorizos, y ahora que no haces mas que pensar en peptilmetilesterasas, o como se diga. Gracias por ser mi amigo has sido de lo mejorcito de Madrid. Ber, ¡qué crack! Menudo cantautor que estás hecho. En serio te admiro, como amigo pero sobre todo como persona, espero que tu aventura por los casinos te vaya genial y montes una fundación sin ánimo de lucro y me das trabajo. Ana, que no te gusta nada lo micro porque tu eres más de macro, espero que la mía te guste. Bar, que has tardado un poco en entrar al grupo pero que ahora eres imprescindible. Tony que al final parecía mas tu tesis que la mía, aunque dijese por ahí que iba sobre mitocondrias. Soy afortunado de contar con un amigo como tú, espero que por muchos años. A los de Bilbao, que han tenido la suerte de verme solo cuando estaba de fiesta, también va por vosotros, pero como ninguno de vosotros va a leerlo ya os lo diré en persona.

Ahora para terminar por todo lo alto continuaremos con la familia. A mi padre que siempre ha estado demostrándome lo orgulloso que se sentía del camino que estaba siguiendo. Espero que haya cumplido las expectativas, y que de verdad estés orgulloso de mí de nuevo. A mi madre, por supuesto, que en ocasiones hasta luchaba del lado de los precarios más que yo mismo y se indignaba por las condiciones que nos daban a los predoctorales. A mi hermana que siempre ha sido una de mis mejores amigas. A mi hermano porque siempre me ha enseñado que para conseguir lo que se quiere solo hace falta tener ambición y una buena cabeza. Eres un genio, lo que yo he alcanzado no es nada comparado con donde has llegado. A mis sobrinos porque ellos me recuerdan cual es el verdadero sentido de nuestro trabajo. A mi abuela que voy a echar tantísimo de menos el día D cuando encuentre su silla vacía entre el público. ¡Cómo habría disfrutado! Te echo de menos. A Eddie porque con él las risas están aseguradas. A Ana por demostrar tanta curiosidad por mi trabajo, lo que me hizo ver lo interesante que podía ser lo que estaba haciendo.

Pero la siguiente merece un apartado especial, Ara sin ti esto no tendría sentido, además de que me habría resultado imposible. Gracias por soportarme en los malos momentos, pero sobre todo gracias porque cada vez que me ocurrían cosas buenas te alegrabas incluso más que yo. Poder compartirlo contigo hacía que tuviesen incluso más valor. Espero ser de la misma ayuda que tú cuando dentro de poco estés en la misma situación. Nunca podré agradecerte lo suficiente el que entrases en mi vida.

A los que me haya podido dejar en el tintero que sepan que no ha sido adrede, espero que sepáis perdonarme. Gracias.

RESUMEN

El factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) es un mediador fibrotico sobreexpresado en lesiones ateroscleróticas humanas, infarto de miocardio y en modelos experimentales de hipertensión. Varios estudios sugieren un importante papel de la Endotelina-1 (ET-1), la Angiotensina II (Ang II) y el factor transformador del crecimiento (TGF- β) en enfermedades vasculares. El primer objetivo de esta tesis fue estudiar si la ET-1 regula CTGF. En CMLV obtenidas de aorta de rata la ET-1 aumentó de manera significativa la expresión de ARNm de CTGF, la actividad del promotor de CTGF y la producción de proteína a través del receptor ET_A. El bloqueo de CTGF, con un oligonucleótido antisentido, disminuyó la producción de fibronectina y colágeno tipo I inducidos por ET-1. El segundo objetivo fue determinar si existe interacción entre ET-1, Ang II y TGF- β en procesos de fibrosis vascular y sus mecanismos intracelulares. En CMLV la ET-1 a través del receptor y de la ruta de RhoA/quinasa de Rho induce la producción de CTGF. La regulación de CTGF por ET-1 es independiente de TGF- β , ya que la ET-1 no indujo la expresión génica ni la producción de TGF- β y además la producción de CTGF por ET-1 es independiente de TGF- β , mostrando diferencias con Ang II. En esta tesis encontramos una relación directa entre ET-1 y Ang II, ya que el antagonista del receptor ET_A disminuyó la inducción de CTGF dependiente de Ang II, esto podría indicar que la ET-1 es mediadora de las acciones de Ang II. El TGF- β regula procesos de fibrosis actuando a través de la ruta de las proteínas Smad. Nuestros resultados demuestran que la Ang II activa las proteínas Smad en células vasculares. Las proteínas Smad están implicadas en la sobreexpresión de CTGF y de proteínas de MEC inducidas por la AngII, independientemente del TGF- β . Este nuevo hallazgo sugiere que la activación de Smad podría estar implicada en los efectos profibrogénicos de la AngII en enfermedades vasculares. Los inhibidores de la reductasa de la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) (o estatinas), tienen efectos beneficiosos ampliamente probados en las enfermedades cardiovasculares. En esta tesis hemos encontrado que en CMLV las estatinas aumentaron la activación de la ruta de las Smad por TGF- β . Además en las CMLV las estatinas también indujeron la síntesis de TGF- β y la producción del receptor de TGF- β tipo II, lo que llevó a un aumento de las respuestas dependientes del TGF- β . Las estatinas provocan que las CMLV sean más susceptibles a la apoptosis inducida, y un aumento de la sobreexpresión de MEC inducida por TGF- β . Nuestros datos sugieren que los efectos beneficiosos de las estatinas podrían estar mediados, al menos en parte, por la ruta de señalización TGF- β /Smad.

Nuestros datos sugieren que el CTGF podría ser un mediador de los efectos cambios vasculares observados en respuesta a estos factores.

SUMMARY

Connective tissue growth factor (CTGF) is a novel fibrotic mediator that is overexpressed in human atherosclerotic lesions, myocardial infarction, and experimental models of hypertension. In vascular smooth muscle cells (VSMCs) there are several studies that suggest an important role of Endothelin-1 (ET-1) in cardiovascular disorders. The first aim of this thesis was to analyze whether ET-1 could induce CTGF. ET-1 upregulated CTGF mRNA expression, promoter activity, and protein production. The blockade of CTGF by a CTGF antisense oligonucleotide decreased fibronectin (FN) and type I collagen expression in ET-1-treated cells. The second aim was to determine whether an interaction among Ang II, TGF- β and ET-1 exist and their molecular mechanisms involved. ET-1 via ET_A, and through RhoA/Rho kinase activation increased CTGF gene expression and production. In VSMCs, ET-1 have TGF- β -independent regulation of CTGF because there is not a TGF- β gene or protein upregulation and the presence of neutralizing transforming growth factor- β (TGF- β) antibody did not modify ET-1-induced CTGF production. We have found an interrelationship between Ang II and ET-1 because the ET_A antagonist diminished CTGF upregulation caused by Ang II. Our results show that, in cultured VSMCs, ET-1, independently of TGF- β and through the activation of several intracellular signals via ET_A receptors, regulates CTGF. Ang II participates in vascular fibrosis. TGF- β was considered the most important fibrotic factor and Smad proteins are essential components of TGF- β signaling system. Our aim was to investigate whether AngII activates the Smad pathway in vascular cells, evaluating CTGF and ECM proteins. Our results show that Ang II activates the Smad signaling system in vascular cells, in vivo and in vitro. Smad proteins are involved in AngII-induced CTGF and ECM overexpression independently of TGF- β . This novel finding suggests that Smad activation could be involved in the profibrogenic effects of AngII in vascular diseases. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors (or statins), exert proven beneficial effects on cardiovascular diseases. We have found that in VSMC statins increased the activation of Smad pathway by TGF- β . In addition, in VSMC statins also induced TGF- β synthesis and TRII upregulation, leading to an increase in TGF- β -dependent actions. Statins make VSMCs more susceptible to TGF- β induced apoptosis, and increase TGF- β dependent ECM upregulation. Our data describe a close relationship between statins and TGF- β in different aspects of the atherosclerotic process, and suggests that the beneficial effects of statins could be mediated by modulation of the TGF- β /Smad pathway.

These novel findings suggest that CTGF could be a mediator of the vascular changes observed in response to these factors in vascular diseases.

CLAVE DE ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	7
Las células de músculo liso vascular en las enfermedades vasculares	7
La Aterosclerosis	8
El factor de crecimiento del tejido conectivo	10
El sistema de la Endotelina	12
Sus isoformas y su función	12
Biosíntesis y Regulación	12
Regulación Transcripcional	12
Los enzimas formadores de endotelina	13
Los factores que regulan su síntesis	13
Clasificación y función de los receptores	14
El Sistema Renina Angiotensina	16
La Angiotensina II	16
La Angiotensina II	17
Receptores de Angiotensina II	17
El sistema renina-angiotensina y la aterosclerosis	18
La actividad de la Ang II en la aterosclerosis	19
La Ang II regula la expresión de las moléculas de adhesión	19
El factor de transformador del crecimiento, TGF-β	20
Los receptores del TGF- β	21
El TGF- β en la patología vascular	22
La señalización por las proteínas Smad	25
OBJETIVOS	29
MÉTODOS Y RESULTADOS	33
La Endotelina-1 aumenta CTGF, vía receptores ET_A, en células de músculo liso vascular.	33
La Ang II activa la ruta de señalización de las Smad mediante un mecanismo independiente de TGF-β, en células de músculo liso vascular.	44
El TGF-β es mediador de las acciones de las estatinas sobre las células de músculo liso vascular.	54
DISCUSIÓN	73
1. La ET-1 induce CTGF en CMLV cultivadas para promover la producción de proteínas de la MEC.	73
2. La Ang II activa la ruta de señalización de las Smad de manera independiente del TGF-β...	77
3. El TGF-β es un mediador de las Acciones de las estatinas sobre las CMLV.....	80
4. La regulación del CTGF es un evento clave en el desarrollo de la fibrosis vascular	84
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXO	113

CLAVE DE ABREVIATURAS

ALK	Quinasa similar a la activina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análisis de la varianza entre grupos
AP-1	Proteína activadora 1
AT ₁	Receptor 1 de AngII
AT ₂	Receptor 2 de AngII
bFGF	factor básico de crecimiento de fibroblastos
BMP	Proteínas morfogénicas del hueso
BSA	Albúmina bovina sérica
BQ123	Antagonista del receptor ET _A
BQ788	Antagonista del receptor ET _B
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CE	Células Endoteliales
CMLV	Células de músculo liso vascular
Col-1	Colágeno tipo 1
CTGF	Factor de crecimiento conectivo tisular
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima convertidor de angiotensina
ECE	Enzima convertidor de Endotelina
EDTA	Ácido etilendiaminetetracético
EGF	Factor de crecimiento epidermico
ELISA	Corresponde a las siglas: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMSA	Ensayo de retardo de movilidad electroforética
ERK-1	Quinasa de respuesta extracelular-1
ERK-2	Quinasa de respuesta extracelular-2
ET-1	Endotelina-1
ET _A	Receptor de Endotelina tipo A
ET _B	Receptor de Endotelina tipo B
ET _C	Receptor de Endotelina tipo C
FN	Fibronectina
G3PDH	Gliceraldehido 3 fosfato dehidrogenasa
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
iECA	Inhibidor de la ECA

IFN- γ	Interferon- γ
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFBP	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
I κ B	Subunidad inhibitoria κ B
IL	Interleuquina
JNK	Quinasa amino terminal c-jun
L-NAME	Nitro-l-arginina metil ester
LAP	Péptido asociado a latencia
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LTBP	Proteína de unión al TGF- β latente
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos-1
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasa de Matriz
NF- κ B	Factor nuclear de transcripción κ B
NO	Óxido nítrico
PAI-1	Activador del plasminógeno
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PTK	Proteínas tirosina quinasas
REDOX	Reacciones de óxido-reducción
ROCK	Quinasa de Rho
ROS	Especies reactivas de oxígeno
STF	Suero bovino fetal
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SMA	Actina de músculo liso
SRA	Sistema renina angiotensina
TGF- β	Factor transformador del crecimiento
TIMP	Inhibidor tisular de las metaloproteinasas
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
TRI	receptor de TGF- β de tipo I
TRII	receptor de TGF- β de tipo II
TSP-1	Trombospondina-1
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
Y27632	Inhibidor de la ROCK

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las células de músculo liso vascular en las enfermedades vasculares

Las células de músculo liso vascular (CMLV) participan de forma directa en el desarrollo de las principales enfermedades vasculares. Por ejemplo en la hipertensión son las principales efectoras del daño inducido por angiotensina II (Ang II). A ello contribuyen mediante la producción de citoquinas y quimioquinas, y la inducción la expresión en la superficie celular de moléculas de adhesión que favorecerán el proceso inflamatorio. Además participan en la acumulación de proteínas de la matriz extracelular (MEC), que finalmente conducirá a fibrosis vascular. Sin embargo si hay una enfermedad en la que las CMLV tienen un papel principal esa es la aterosclerosis.

Diversas enfermedades vasculares implican la proliferación de las CMLV como el mecanismo primario de su patofisiología. Estas condiciones clínicas incluyen restenosis por cánula, la vasculopatía por trasplante y al fallo en el implante de bypass venoso ²⁵. Ironicamente estas condiciones se desarrollan como consecuencia de las técnicas para tratar las enfermedades ateroscleróticas oclusivas. De hecho, el 30-40% de los pacientes que han recibido una angioplastia por balón percutaneo desarrollarán enfermedades ateroscleróticas dentro de los primeros 6 meses ²²¹. Con los nuevos stent recubiertos desarrollados el porcentaje se ha disminuido al 20% el cual es aun inaceptablemente alto ²²¹. El porcentaje de fallo del trasplante venoso está entre un 10 y un 30% anual ¹⁴². Estas enfermedades proliferativas vasculares se inician por daños mecánicos, bioquímicos o inmunológicos en la pared vascular. El daño vascular dispara la cascada de eventos los cuales incluyen la desaparición o disfunción endotelial, inflamación y la activación de las CMLV y su proliferación. En las lesiones vasculares se pueden detectar millares de factores de crecimiento y citoquinas. Estos intermediarios pueden ser liberados por las EC disfuncionales, las células inflamatorias, las plaquetas y las CMLV, mediando en la quimioaxis, migración celular, proliferación, apoptosis y modulación de la MEC ¹⁹³. En esta tesis profundizaremos en alguno de estos factores, en concreto en la Angiotensina II (Ang II), la Endotelina-1 (ET-1) y el factor transformador del crecimiento- β (TGF- β) y sus acciones en las CMLV. Para ello estudiaremos la proteína el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) como ejemplo de la complejidad de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de esta enfermedad, ya que dependiendo del factor que lo este induciendo y de las condiciones en las que se produzca, el significado puede ser beneficioso o dañino.

La Aterosclerosis

La aterosclerosis implica múltiples procesos incluyendo disfunción endotelial, inflamación, proliferación vascular y alteraciones de la MEC. El conocimiento de la patofisiología de la aterosclerosis y las enfermedades vasculares relacionadas ha cambiado a lo largo de la última década, proporcionando nuevas perspectivas para las estrategias de prevención y terapia. Estudios recientes han enfatizado la importancia de la inflamación en la mediación de todos los estadios de la aterosclerosis ^{128, 192}. Sin embargo, además de la inflamación, un proceso clave de la aterosclerosis implica la proliferación de las CMLV^{193, 194, 216} (Fig. 1). Uno de los precursores del desarrollo de la lesión en humanos puede ser la acumulación focal de CMLV dentro de la íntima ²¹⁴. La función exacta de las CMLV en la aterosclerosis todavía está sujeta a debate ^{214, 216}. La proliferación vascular contribuye a la patología de la aterosclerosis. La contribución de la proliferación vascular a la patofisiología de la restenosis por cánula, la vasculopatía por trasplante y al fallo en el implante de bypass venoso, que son problemas de especial importancia clínica. Por ello, está emergiendo una nueva estrategia dirigida a inhibir dicha proliferación centrándola en la regulación del ciclo celular.

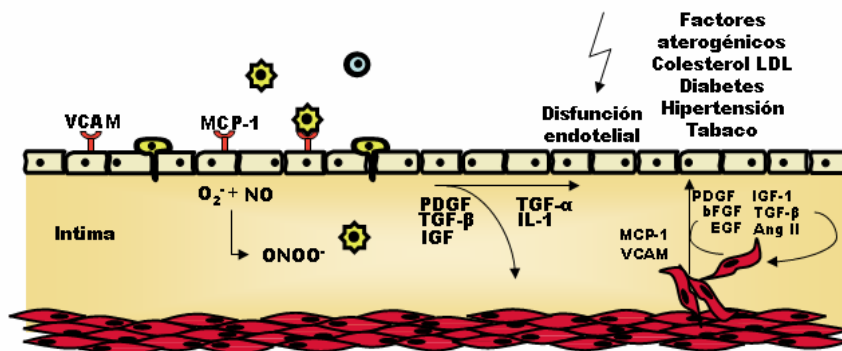
En la aterosclerosis se pueden distinguir varias fases. En la temprana se produce un daño endotelial lo que provoca una disfunción que inicia la activación de las CMLV. En ese momento las CMLV pueden contribuir al desarrollo de la placa de ateroma a través de la producción de mediadores proinflamatorios como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM), así como a través de la síntesis de proteínas de la MEC necesarias para la retención de las lipoproteínas ²¹⁴.

En una siguiente fase donde ya se distingue una lesión, aparecen las células espumosas y la inflamación es muy acusada. Aquí es donde se produce la proliferación de las CMLV y su migración a la íntima. Dentro de la íntima siguen produciendo mediadores inflamatorios que aceleran el desarrollo de la lesión.

Sin embargo, las CMLV pueden ser también importantes en el mantenimiento de la estabilidad de la placa mediante de la formación de una cápsula fibrosa firme. De hecho, en las lesiones con gran carga de grasa en las que la capsula fibrosa es débil y fina hay evidencias de apoptosis de las CMLV, especialmente en la región de los hombros, asociada a la presencia de inflamación ⁶¹. Además, en ambientes inflamatorios locales pueden inducir la expresión de colagenasa y bloquear la expresión de los inhibidores proteolíticos, de manera que se muestra una cápsula fibrosa débil y susceptible de romperse

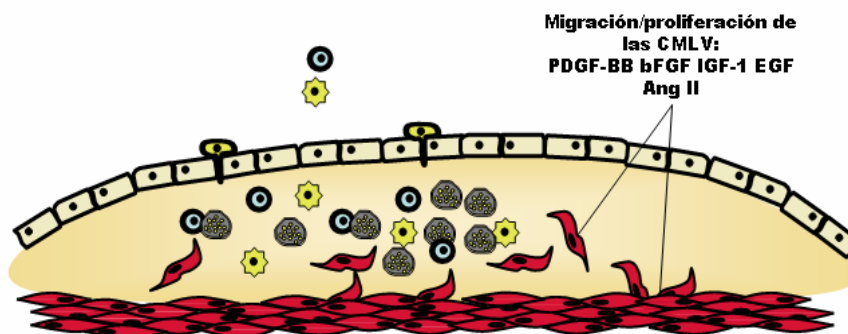
^{128, 216}.

En lesiones más avanzadas los fibroblastos y las CMLV con calcificación extracelular forman una placa fibrocalcificada. El origen de las CMLV en la placa aterosclerótica es intrigante. El engrosamiento de la íntima aparece durante el desarrollo normal y el envejecimiento. Las CMLV de la íntima, incluyendo aquellas observadas en las lesiones ateroscleróticas podrían tener un origen monoclonal ²¹⁵.



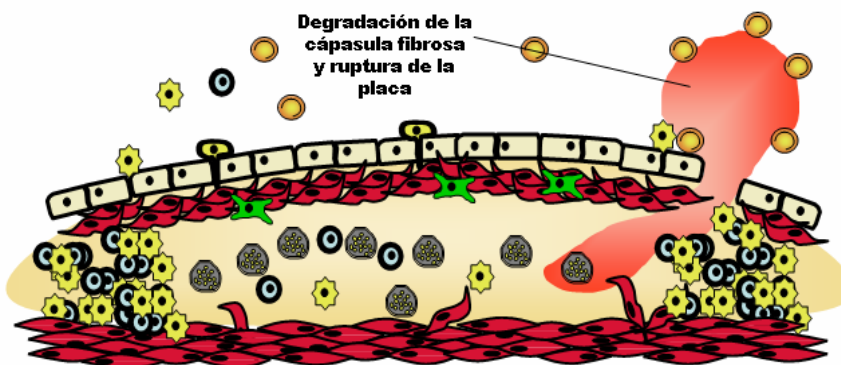
Inicio de la lesión aterosclerótica:

Aparición de la disfunción endotelial y activación de las CMLV



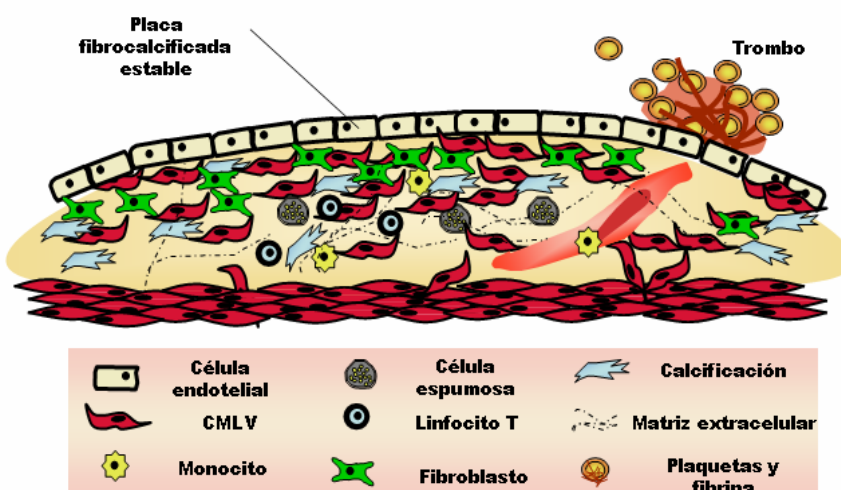
Lesión aterosclerótica temprana:

Aparición de las células espumosas mayor intensidad en la inflamación. Migración y proliferación de las CMLV.



Lesión aterosclerótica vulnerable:

Cápsula fibrosa fina con apoptosis de las CMLV. Aparece la estría grasa. Inflamación muy intensa sobre todo en la región de los hombros.



Lesión aterosclerótica avanzada:

Abundancia de CMLV. Gran presencia de fibroblastos lo que lleva a una acumulación de matriz. Aparece calcificación extracelular.



FIGURA 1. Esquema del desarrollo de la lesión aterosclerótica

Esto indicaría que la neointima surge de la proliferación de un clon preexistente de CMLV. Aunque el examen de las lesiones ateroscleróticas humanas no ha producido ninguna evidencia de una gran

replicación^{68, 172}, esta puede ocurrir muy tempranamente, en un bajo grado durante el desarrollo de la aterosclerosis o bien en un grado alto de manera esporádica. Las CMLV no está claro de donde provienen. Los datos experimentales también indican que las CMLV de la íntima pueden provenir de la media o la adventicia²¹⁸. Asimismo, las células endoteliales (EC) embrionales se ha visto que son capaces de transdiferenciarse a células mesenquimales que expresan actina de músculo liso⁴². Estudios animales han indicado que las células pueden provenir también de subpoblaciones de células circulantes derivadas y no derivadas de la médula ósea^{29, 85, 209}.

En resumen, la función de las CMLV de la íntima en la historia natural de la lesión aterosclerótica parece ser el actuar como foco para el desarrollo de las lesiones, quizá acelerando la acumulación de lípidos y la quimiotaxis de los macrófagos. La proliferación es probablemente un evento temprano, seguido por un proceso crónico que proporciona una cápsula esencialmente fibrosa que previene la ruptura de la placa. (Fig 1)

El factor de crecimiento del tejido conectivo

El CTGF es una proteína secretable rica en cisteínas que regula proliferación/apoptosis celular, angiogénesis, migración, adhesión y fibrosis¹¹⁵. CTGF se induce potentemente por estrés mecánico o presión estática^{87, 265}, y por varios factores implicados en el daño vascular, incluyendo concentraciones elevadas de glucosa, el TGF- β , la Ang II y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), pero no por otros factores como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y se inhibe por el Adenosin monofosfato cíclico y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)^{115, 203}. El CTGF se ha descrito recientemente como un factor profibrótico mediador de algunas de las repuestas inducidas por TGF- β , incluyendo fibrosis y apoptosis¹⁸¹. In vivo, el bloqueo de la síntesis del CTGF o de su actividad reduce la producción de colágeno inducida por TGF- β (Fig 2). Hay datos que sugieren que el CTGF y el TGF- β actúan de manera sinérgica para promover fibrosis crónica. En ratones, la co-inyección subcutánea de ambos produce una fibrosis sostenida y persistente. El CTGF se sobre expresa en diversos desordenes fibróticos en la piel, el riñón, el pulmón y el sistema cardiovascular¹⁸¹. Se ha descrito sobreexpresión de CTGF asociada a la acumulación de MEC en lesiones ateroscleróticas, después del infarto de miocardio y en tejido cardíaco de modelos experimentales de hipertensión^{50,56, 203}. Dependiendo del tipo celular, el CTGF tiene diferentes actividades biológicas¹⁸¹. En CMLV regula la proliferación/apoptosis celular, la migración y la síntesis de MEC⁵². En estas células, diferentes factores implicados en el daño vascular, incluyendo estiramiento mecánico, concentraciones elevadas de glucosa, Ang II y TGF- β pueden inducir la producción no sólo de CTGF sino que también de proteínas de la MEC. Esta producción de proteínas de la MEC puede revertirse bloqueando la producción endógena de CTGF²⁰³, indicando que CTGF es un mediador aguas abajo de fibrosis. En la presente tesis exploraremos si la

ET-1 también es capaz de sobreexpresar CTGF, y si este factor es un mediador de la acumulación de MEC inducida por ET-1.

Se ha descrito que el CTGF se une directamente al TGF- β . Esta unión lleva a una potenciación de la actividad del TGF- β . El mecanismo se basa en una función de chaperona del CTGF que incrementa la afinidad del TGF- β por sus diferentes receptores, por lo que sus respuestas son más intensas y prolongadas ¹⁸⁰. Esta no es la única forma por la que el CTGF ayuda a las respuestas del TGF- β . La producción endógena de CTGF por el TGF- β lleva a una supresión transcripcional del Smad-7 a través de la inducción del factor de transcripción del gen de respuesta temprana inducible por TGF- β (TIEG-1). Mediante este mecanismo el TGF- β bloquea la regulación por retroalimentación a través del Smad-7, perpetuando la activación de la señalización del TGF- β ²⁴⁴. Esto puede ser relevante en condiciones patofisiológicas en las que el CTGF está sobreexpresado.

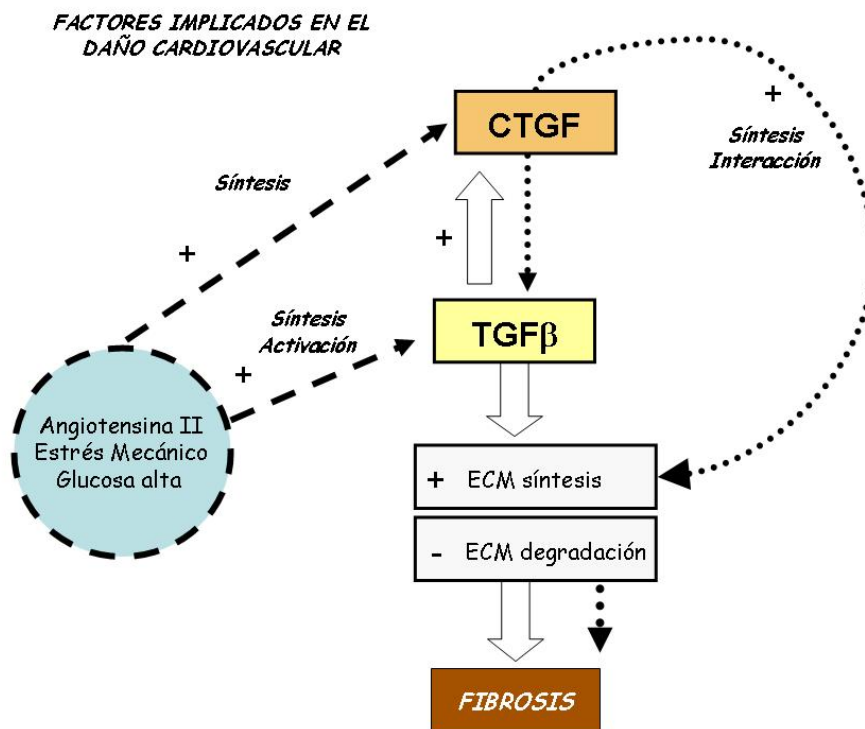


FIGURA 2. Esquema de la regulación y las acciones de CTGF en la fibrosis. Varios factores regulan el CTGF, incluido el TGF- β . Ambos son capaces de producir fibrosis. El CTGF a su vez potencia las acciones de TGF- β para producir una fibrosis más relevante.

Hay numerosas evidencias que demuestran que el TGF- β participa en los procesos fibróticos *in vivo*. El bloqueo de la actividad del TGF- β con anticuerpos neutralizadores y decorina, un secuestrador de su forma activa, ha demostrado una reducción de la fibrosis en modelos experimentales de daño agudo. Sin embargo, el ratón deficiente en TGF- β es letal, desarrollando un defecto en la reparación de herida, con problemas en los depósitos de colágeno, y presenta un fenotipo hiperinflamatorio ¹³³. Esto sugiere que se debe encontrar una diana terapéutica que sea más específica para las enfermedades fibróticas. Los ratones heterocigotos para la delección del gen del CTGF presentan defectos en la organización y

síntesis de la matriz durante la osteogénesis, teniendo como resultado un defecto mayor en el desarrollo del componente esquelético de la caja torácica y consecuentemente mueren inmediatamente después del nacimiento¹⁸⁵. No hay datos que sugieran que el CTGF tenga un papel positivo en las reacciones inflamatorias e inmunes. Además es un mediador de la fibrosis causada por TGF- β y otros factores implicados en daño tisular, por lo que CTGF podría ser una diana nueva más útil en las terapias antifibróticas. El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la regulación del CTGF puede ser muy útil en el tratamiento las enfermedades cardiovasculares.

El sistema de la Endotelina

Sus isoformas y su función

Después del descubrimiento del factor de relajación del endotelio²¹ se aisló un factor de contracción a partir de endotelio bovino pulmonar y aórtico^{66, 83, 173}. Se identificó su secuencia génica en 1987 y se denominó endotelina (ET)^{144, 259, 260}. La ET es una familia de cuatro péptidos de 21 aminoácidos, ET-1, ET-2, ET-3,⁹² y ET-4 (constrictor intestinal vasoactivo)²⁰⁵. También se han identificado ETs de 31 residuos¹⁰⁵. La isoforma predominante es la ET-1, la cual tiene una alta similitud con el veneno de las serpientes de la familia Atractaspis^{106, 144} y es un vasoconstrictor muy potente. Además de sus efectos cardiovasculares, la ETs están involucradas en el desarrollo embrionario¹¹¹, broncoconstricción²³⁶, crecimiento de la próstata²⁴⁵, carcinogénesis¹¹² y la función gastro intestinal^{189, 246} y endocrina^{55, 101, 195}.

Biosíntesis y Regulación

En el endotelio, la ET-1 se libera principalmente en dirección a las CMLV, sugiriendo un papel paracrino²⁴³. La ET-1 también se produce en otras células involucradas en la enfermedad vascular, como leucocitos²²², macrófagos⁴⁸, CMLV⁷⁶, cardiomiocitos^{58, 96} y células mesangiales^{60, 165} y su síntesis está regulada de manera autocrina^{4, 15, 47, 58, 67, 76, 96, 97}.

Regulación Transcripcional

La transcripción del gen de la preproendotelina está regulado a través de los complejos sensitivos de forbol-éster c-fos y c-jun¹²⁰, los elementos reguladores de la fase reactante aguda⁹³ y su promotor tiene sitios de unión para el factor nuclear-1¹⁶ la proteína activadora-1 (AP-1) y GATA-2^{43, 157}. Recientemente se ha demostrado la implicación de las proteínas Smad en su regulación por TGF- β ¹⁹⁰. De la traducción de este transcrito tiene como resultado la formación un péptido de la preproendotelina de 203 aminoácidos, el cual se corta por una convertasa furina⁴⁰ a un péptido de 38 aminoácidos, la ET-1 grande (1-38)⁸⁶.

Los enzimas formadores de endotelina

Una vez formada la ET-1 grande se procesa a ET-1₍₁₋₂₁₎ por proteólisis entre la Triptona 21 y la Valina 22 por el enzima convertidor de endotelina-1 (ECE-1), del cual existen 4 isoformas (a,b,c y d),^{212, 217, 223, 237, 238, 255} y por el ECE-2 y la quimasa²⁵⁴. Además, la quimasa corta la ET-1 grande en el enlace entre la tirosina 31 y la glicina 32, obteniéndose también ET-1 (1-31)¹⁶⁶. El ECE-3 convierte selectivamente la ET-1 grande en ET-3⁸⁰. Los ECEs se localizan en al endotelio^{212, 217, 223, 238, 255}, las CMLV^{138, 156, 196}, los cardiomiocitos^{59, 108} y los macrófagos^{59, 156}. Se ha observado actividad ECE en la fracción lipoprotéica del suero humano¹⁷⁵. Las ECEs pertenecen a la familia de las metaloproteinasas^{50, 238, 255}. La expresión del ECE-1 se regula a través de mecanismos dependientes de la quinasa protéica C²³⁵ los receptores ET_B¹⁶⁸ los factores de transcripción ets-1¹⁷⁶ y diversas citoquinas²⁶⁴. En ratones deficientes en ECE-1, los niveles tisulares de ET-1 se reducen sólo un tercio. Por lo que las rutas independientes de la ECE también contribuyen a la producción de ET-1. De hecho, las quimasas generan ET-1₍₁₋₂₁₎²⁵⁴.

Además se han clonado dos nuevos enzimas formadores de ET-1₍₁₋₂₁₎, una metaloproteinasa no ECE y una quimasa de CMLV (Fig 3).

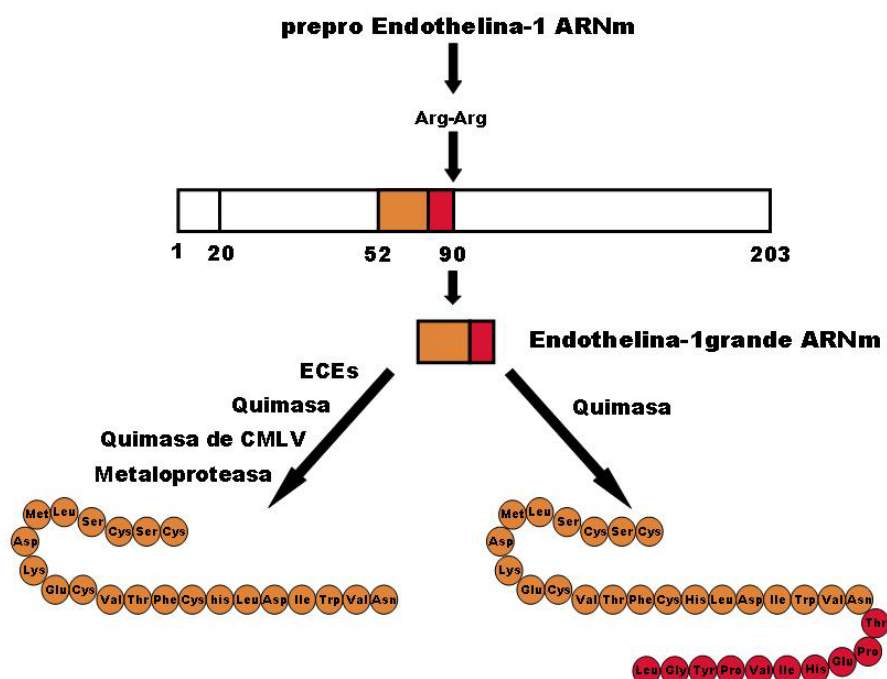


FIGURA 3. Procesamiento de la Endotelina-1 y la ET-1 grande.

Los factores que regulan su síntesis

La síntesis de la endotelina se regula por factores fisicoquímicos como el estiramiento repetido¹³⁶ el estrés por “shear”¹⁴⁰ y el pH²⁵². El ejercicio sobrerregula la expresión miocárdica de ET-1, lo que

sugiere que ET-1 puede tener un papel en el mantenimiento de la función cardíaca ¹³⁷. La hipoxia es un estímulo muy potente para la síntesis de ET-1 ¹³⁹ lo cual puede ser importante en situaciones de isquemia. La biosíntesis de la ET-1 se estimula por factores de riesgo cardiovascular como niveles elevados de LDL oxidada ²⁴ y glucosa ²⁵⁷, la deficiencia de estrógenos, ³ la obesidad ¹² la cocaína ⁸², el envejecimiento ¹³ y los mediadores de coagulación como trombina ²³. También estimulan su producción vasoconstrictores ^{15, 91, 96}, citoquinas ^{20, 37} y las moléculas de adhesión ²¹³. Los inhibidores de la síntesis incluyen el óxido nítrico (NO) ²³, la prostaciclina ²²⁷, los péptidos natriuréticos atriales ^{58, 242} y los estrógenos ¹⁰⁹. Recientemente también se ha demostrado que el TGF- β puede inducir la expresión de ET-1 en CE a través de un mecanismo en el que están implicadas las proteínas Smad y la activación del factor de transcripción AP-1 ¹⁹⁰.

Clasificación y función de los receptores

La ET-1 activa receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G_i. Se han clonado cinco receptores de ET. Los mamíferos poseen ET_A ^{10, 129} y ET_B ^{206, 207} y existe un receptor dual de Ang II/ET-1 en ratas ¹⁹⁷. Hay un nuevo ET_B en pájaros ¹¹⁹ se ha encontrado un ET_C en ranas selectivo para ET-3 ¹⁰². En la vasculatura, en las CMLV se encuentran los receptores ET_A, mientras que los receptores ET_B se localizan principalmente en CE y en menor medida en CMLV y macrófagos. ET-1, principalmente vía ET_A, activa la fosfolipasa C, lo cual lleva a una acumulación de inositol trifosfato y el calcio intracelular, y esto a su vez promueve una vasoconstricción duradera. También induce crecimiento celular, adhesión celular, fibrosis y trombosis. Sin embargo el papel de los receptores ET_B todavía es controvertido porque aquellos expresados en las CE también produce vasodilatación, liberación de NO y previene de la apoptosis, y podría oponerse a las acciones del receptor ET_A ^{133, 185}. De hecho, en condiciones patológicas se ha descrito activación de ET_B en CMLV, con una función similar a la de ET_A, con lo que podría amplificar las respuestas inducidas por ET-1 ⁸¹ (Fig 4).

Acciones Cardiovasculares

Además de los efectos vasoconstrictores y mitogénicos ^{4, 109, 260}, la ET-1 estimula la producción de factores como el VEGF ¹⁵⁰, el factor básico de crecimiento de fibroblastos-2 (bFGF-2) ¹⁸⁰, y epiregulina ²³⁰ y fibronectina (FN) ¹⁴³ y potencia el efecto del TGF- β ²⁵¹ y el factor derivado de plaquetas ²⁶². Cabe resaltar que la ET-1 interacciona con las células sanguíneas para estimular la adhesión de neutrófilos ¹³² y la agregación plaquetaria ¹⁰⁷ y producir MCP-1⁷⁷. Finalmente la ET-1 promueve la progresión del ciclo celular de manera autocrina ^{98, 179, 228}. La ET-1 predominantemente a través del receptor ET_A, promueve la vasoconstricción, el crecimiento celular, la adhesión celular y la trombosis; por lo que la ET-1 es una diana prometedora para la terapia cardiovascular. Se han descrito niveles elevados en plasma en aterosclerosis, infarto de miocardio, angina inestable, hipertensión pulmonar, y fallo cardíaco ^{121, 133, 185}. Se ha establecido una correlación directa entre la cantidad de ET-1 presente en la lesión y la gravedad de la

angina en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria ²⁶⁹. Niveles de ET-1 altos de manera crónica produce fibrosis vascular con acumulación de proteínas de la MEC, fibrosis miocárdica e hipertrofia ^{133, 185}. En diferentes modelos experimentales de enfermedades cardiovasculares, el tratamiento con antagonistas de ET-1 presentó sustanciales efectos beneficiosos ^{14, 18, 24, 65, 110, 154} (Fig 5).

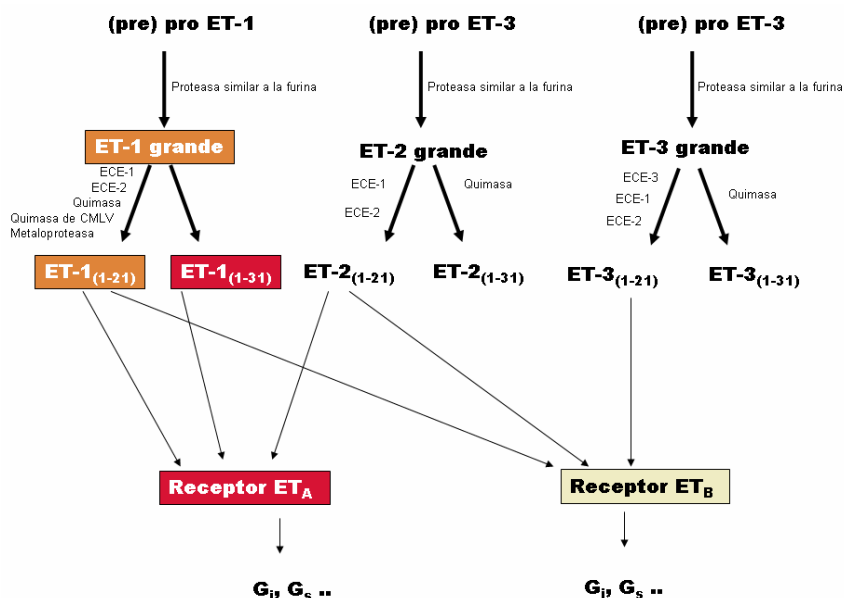


FIGURA 4. Sistema de la Endotelina. metabolismo de las distintas isoformas de la Endotelina desde el ARNm hasta su unión a los receptores

ET-1 estimula la producción de citoquinas, como el TNF- α . La ET-1 emplea diversas señales intracelulares, incluyendo producción de radicales libres de oxígeno y activación de proteínas G pequeñas y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) ^{54, 113, 258}, las cuales están involucradas en el daño vascular y la fibrosis. También emplea otros mecanismos bien conocidos del daño vascular como las especies reactivas de oxígeno. Asimismo también activa en las CE mecanismos de protección principalmente a través del receptor ET_B, como la vasodilatación debida a la liberación de NO. También se ha descrito recientemente que la ET-1 puede inhibir la migración y la proliferación de las CE cuando está inducida por TGF- β . Lo que la convierte en una mediadora de las acciones antiangiogénicas del TGF- β ³⁰.

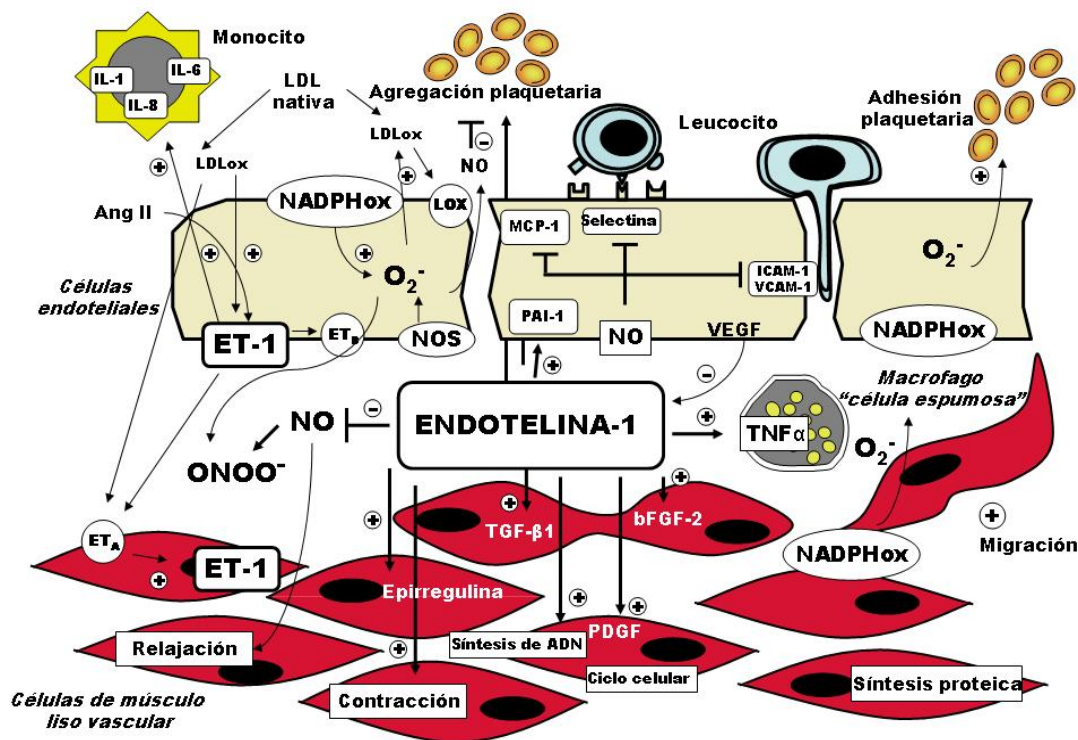


Figura 5. la Endotelina-1 en el daño vascular. La ET-1 participa en los distintos eventos que dan lugar al daño vascular como el reclutamiento de células inflamatoria, la inducción de la proliferación de las CMLV, etc.

El Sistema Renina Angiotensina

El sistema renina angiotensina (SRA) es el principal regulador de la función renal y cardiovascular, presentando un papel clave en la homeostasis de la presión arterial y en el balance de electrolitos. A partir del Angiotensinógeno, precursor de esta ruta se forma Angiotensinal (AngI) por la acción de la Renina. Angiotensina II (AngII), el péptido efector del SRA puede ser hidrolizado tanto por su extremo N terminal, como por su C terminal, su precursor el decapeptido AngI puede ser hidrolizado de manera similar (Fig 6).

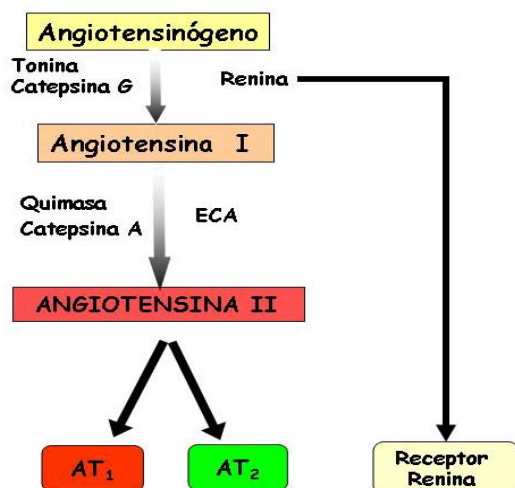


FIGURA 6. Sistema Renina Angiotensina. ECA: enzima conversor de angiotensina,

La Angiotensina II

Los estudios realizados en los últimos diez años han contribuido a cambiar la visión clásica de la Ang II, desde un agente vasoactivo a una verdadera citoquina con un papel clave en la patología cardiovascular y renal. La Ang II es el péptido efector del SRA, presenta una amplia variedad de propiedades biológicas, jugando un papel fundamental en la homeostasis de la presión arterial y el balance de hidroelectrolitos. Este péptido participa en procesos patológicos a través de la regulación del crecimiento celular (proliferación/hipertrofia o apoptosis), y acumulación de matriz extracelular ²⁰². En los últimos años, muchos estudios sugieren que la Ang II es una verdadera citoquina con un importante papel en la respuesta inflamatoria ¹⁹⁹. La mayoría de la información disponible acerca de las propiedades proinflamatorias e inmunomoduladoras de la Ang II se han obtenido de estudios en enfermedades cardiovasculares y renales. Algunos datos han demostrado que Ang II regula directamente funciones celulares inmunes.

Receptores de Angiotensina II

La Ang II se une a dos receptores AT₁ y AT₂. El receptor AT₁ participa en el control de la presión sanguínea, en la regulación del crecimiento celular y en la producción de citoquinas y proteínas de matriz MEC. Este receptor está ampliamente distribuido por los sistemas cardiovascular, renal, endocrino y nervioso ^{39, 155}. El receptor AT₂ causa vasodilatación, apoptosis, inhibición de la proliferación celular y formación de la neoíntima después de daño vascular. También regula la natriuresis renal, la producción renal de NO y el infiltrado glomerular de monocitos ^{199, 202/ 39, 198, 233, 253}. Este receptor se expresa ubicuamente en tejidos mesenquimales del feto humano, pero su expresión disminuye después del nacimiento ¹⁶³. En adultos, la expresión del receptor AT₂ se detecta en páncreas, corazón, riñón, glándulas adrenales, cerebro y vasculatura ^{39, 177, 233}.

Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de proteínas de siete dominios transmembrana y están acoplados a proteínas G, pero los mecanismos moleculares implicados en sus respuestas son diferentes (Fig 8). El AT₁ induce la liberación de calcio, la activación de algunas proteínas quinasas, factores de transcripción y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las diferentes respuestas a las que da lugar la activación de AT₁ ocurren a distintos tiempos. La fosforilación de fosfolipasa C (PLC) y la movilización de calcio ocurren en unos pocos segundos, siendo sucesos de señalización inmediata. Otros procesos de señalización temprana que ocurren en unos minutos son la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), fosfolipasa D (PLD), proteínas tirosina quinasas (PTK), MAPK y activación del factor nuclear κ B (NF- κ B). Sucesos de señalización tardía, que ocurren en horas, incluyen la generación de estrés oxidativo, la sobreexpresión de ARNm y la síntesis de proteínas. El receptor AT₂ estimula el sistema óxido nítrico/cGMP, la activación de factores de transcripción nuclear y la producción de ceramidas .

EL sistema renina-angiotensina y la aterosclerosis

El bloqueo de las acciones de la angiotensina II (Ang II) usando los inhibidores del enzima de conversión de la angiotensina I (iECAs) y/o los antagonistas de los receptores de angiotensina (ARAs) son muy efectivos en el tratamiento de la hipertensión, la insuficiencia cardiaca congestiva y el daño renal progresivo ^{26, 224}. Ensayos clínicos recientes de los iECAs en individuos de alto riesgo para eventos cardiovasculares han demostrado una reducción significativa de las secuelas de la aterosclerosis, incluyendo muerte súbita, infarto de miocardio agudo y el ictus, en comparación con los tratamientos convencionales como los beta-bloqueantes y otros agentes antihipertensivos ^{1, 130, 131, 145, 266}. Los iECAs proporcionaron incluso protección a aquellos pacientes que no tenían hipertensión o disfunción del ventrículo izquierdo, lo que sugiere que los beneficios producidos por los antagonistas de Ang II no dependen de sus acciones antihipertensivas o hemodinámicas ^{130, 266}. Mientras que los estudios clínicos apoyan la hipótesis de que el bloqueo de Ang II disminuye los eventos cardiovasculares, no indican cuál es el posible mecanismo implicado en los beneficios del antagonismo de Ang II o determinan si la Ang II modula la remodelación vascular, especialmente la acumulación de lípidos presente en la aterosclerosis. En la presente tesis trataremos de aportar más luz sobre los mecanismos utilizados por la Ang II para la inducción de fibrosis, con el fin de tratar de entender mejor estos procesos.

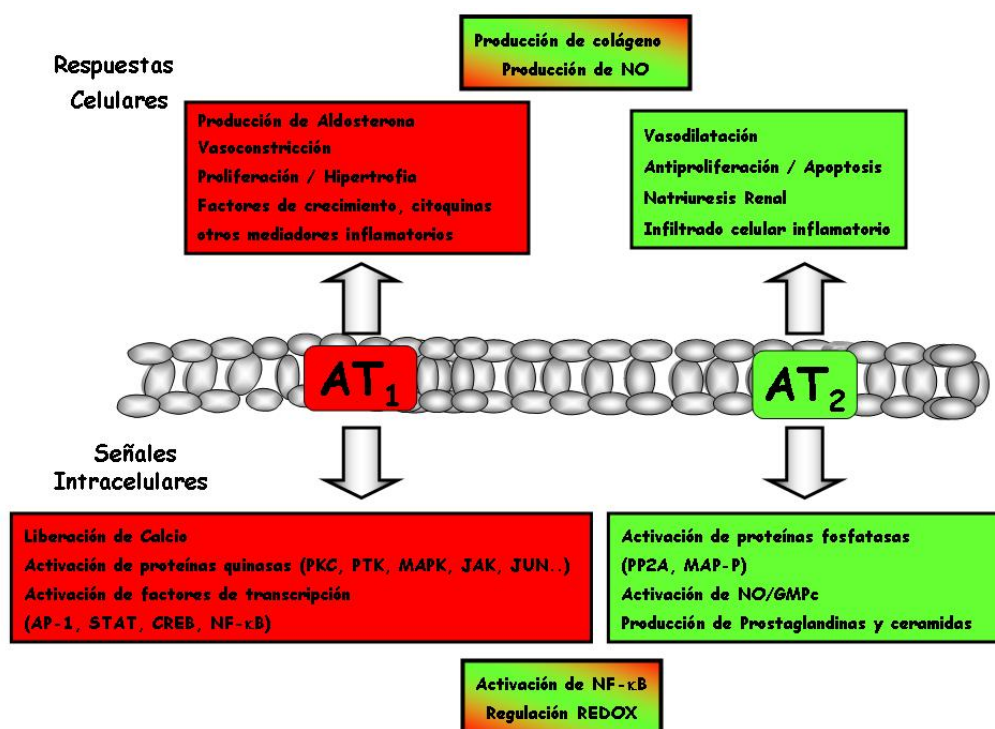


FIGURA 7. Respuestas celulares y mecanismos moleculares activados por Ang II vía receptores AT_1 y AT_2 .

Estudios publicados en los últimos años han demostrado que la Ang II afecta a los factores de riesgo conocidos para promover aterosclerosis así como afectando directamente a los procesos involucrados en la progresión y la estabilidad de la lesión. Incluso se ha sugerido la posibilidad de que la lesión aterosclerótica puede ser revertida usando antagonistas de Ang II. Por otro lado, el estudio Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT), el cual es el estudio mas amplio del resultado del tratamiento de la hipertensión, puso en cuestion si el los iECAs confieren más protección que otros agentes antihipertensivos ².

La actividad de la Ang II en la aterosclerosis

La actividad del SRA está incrementada en la aterosclerosis provocando un aumento en la producción local de la Ang II, amplificando la enfermedad ^{71, 211}. Diversas variantes geneticas dentro del sistema renina angiotensina modulan los niveles plasmaticos y tisulares de los componentes del sistema y han sido asociados a enfermedades cardiovasculares ^{28, 232}. La sinergia entre variables geneticas del sistema renina angiotensina no solo afectan a la severidad de las secuelas de la aterosclerosis (i.e: infarto de miocardio) sino que también modifica la progresión de la aterosclerosis ^{63, 263}. Sin embargo, la actividad reforzada de la Ang II no necesariamente tiene que ser prolongada. Incluso una actividad transitoriamente realizada inicia un proceso de daño ²⁴⁰.

La Ang II regula la expresión de las moléculas de adhesión

Ang II causa la adhesión de monocitos, leucocitos y neutrófilos a las células endoteliales, CMLVs y células mesangiales, a través de la regulación de moléculas de adhesión, incluyendo selectinas (P-, E- y L-selectina), molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), y sus ligandos, las integrinas ^{6, 162, 229} (Fig 8).

Por otra parte, la infusión de Ang II en la microcirculación mesentérica de rata, induce adhesión de leucocitos ¹¹⁴. En CMLV, Ang II regula VCAM-1 e ICAM-1 vía AT1 y activación de MAPK y de las rutas redox, independientemente de la presión sanguínea ²²⁹.

En diferentes modelos experimentales de hipertensión como las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), las ratas transgénicas para renina y angiotensinógeno y en diabetes inducida por estreptozotocina, el aumento en la expresión de moléculas de adhesión disminuyó con los bloqueantes del SRA ²²⁹. En humanos con hipertensión, diabetes y otras enfermedades cardiovasculares, los inhibidores de la ECA disminuyen los niveles de expresión de las moléculas de adhesión en suero, en células circulantes y endoteliales ^{62, 89, 191, 210}. Sin embargo, el efecto de los antagonistas AT1 es aún polémico. En pacientes hipertensos la inhibición de la ECA, pero no el bloqueo de AT1, disminuye los niveles en plasma de las moléculas de adhesión (E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1) ¹⁰⁰. En pacientes sanos de avanzada edad, los antagonistas AT1 reducen los niveles circulantes de VCAM-1, pero no de E-Selectina ¹⁸⁴. En nefropatía diabética, el bloqueo de Ang II disminuye las moléculas de adhesión en plasma ⁸. En diabetes tipo II, el bloqueo de los receptores AT1 disminuye VCAM-1 soluble mientras que

no se han encontrado efectos en ICAM-1, el cuál sí fue disminuido por inhibición de la ECA ⁶². Estudios in vitro demostraron que solo el inhibidor de la ECA enalapril, pero no el antagonista AT1 Losartán, disminuye la adherencia de leucocitos, la expresión de moléculas de adhesión y el daño celular después de reperfusion-isquémica ⁷³. Solamente la combinación de ambos antagonistas AT1 y AT2 bloquearon la migración de leucocitos estimulada por Ang II y la regulación de P-Selectina en ratas ¹⁸². Estos datos sugieren que estudios futuros en humanos son necesarios para determinar el subtipo de receptor implicado en los primeros pasos de la respuesta inflamatoria (Fig 8).

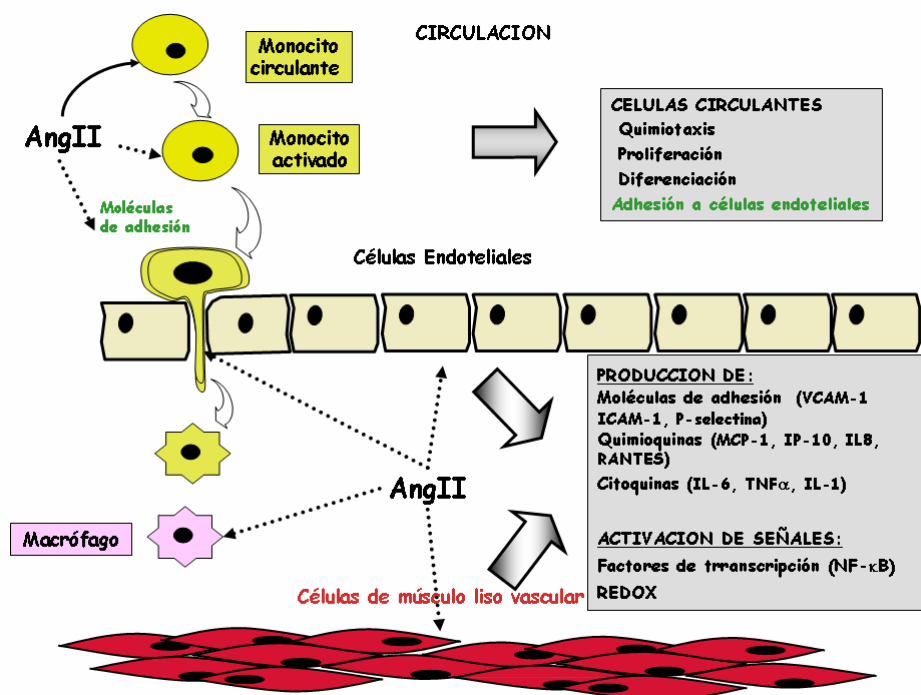


FIGURA 6. Ang II participa en la respuesta inflamatoria. Ang II activa células residentes y circulantes para producir mediadores proinflamatorios a través de la activación de algunos sistemas de señalización intracelular.

El factor de transformador del crecimiento, TGF-β

La familia del factor transformador del crecimiento (TGF-β) esta formada por más de 40 miembros entre los que se encuentran TGF-β, activinas, inhibinas, factores de diferenciación de crecimiento y las proteínas de la morfogénesis del hueso (BMP). Todos los miembros de la familia comparten secuencia y dominios estructurales. Son reguladores multifuncionales de la división celular, diferenciación migración, adhesión, organización y muerte; además promueven la producción de MEC la homeostasis y la embriogénesis ^{99, 147, 160}.

Entre todas las proteínas anteriormente mencionadas, el TGF-β tiene un papel crucial en la homeostasis tisular y el bloqueo de la ruta del TGF-β se ha correlacionado con muchas enfermedades humanas, incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes, fibróticas y cardiovasculares.

Se han descrito tres isoformas diferentes del TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. TGF- β 1 es la más importante para el sistema cardiovascular y esta presente en CE, CMLV, miofibroblastos, macrófagos y otras células hematopóyéticas⁹. La síntesis de TGF- β es un proceso complejo (Fig 9). TGF- β se sintetiza como una proteína inactiva, llamada TGF- β latente. Consiste en una región principal y un péptido asociado a la latencia (LAP). Este péptido interacciona con las proteínas de unión al TGF- β latente (LTBP) anclándolo a la MEC. El TGF- β se activa por corte proteolítico, trombospondina-1 (TSP-1), plasmina, microambientes ácidos, metaloproteinasas y β 6-integrina^{9, 64, 116}. Diversos factores implicados en el daño cardiovascular regulan la síntesis y activación del TGF- β (figure 2). En las CMLV la Ang II estimula la expresión de ARN mensajero y su conversión biológica a la forma activa²⁵⁰. Estudios *In Vitro* han mostrado que la Ang II, a través rutas dependientes de PKC y p38-MAPK, activa la unión de proteínas nucleares al sitio de unión de AP-1 en el promotor de TGF- β 1 estimulando su actividad transcripcional¹⁶⁴. En CMLV, la MMP-2 potencia al TGF- β activo. Durante el daño vascular dentro de la pared aórtica aumenta la expresión tanto del TGF- β como de sus receptores y su señalización²⁴⁸. En células mesangiales la LDL oxidada aumenta TGF- β e induce la transcripción del PAI-1 a través de la ruta de señalización de Smad²²⁶. Algunos de estos factores incrementan la concentración de TGF- β 1 por mecanismos adicionales. La Ang II y la ET-1 estimulan TSP-1, la que a su vez lleva a un aumento de la liberación del TGF- β 1 activo del complejo latente inactivo¹¹⁶ (Fig 9).

Los receptores del TGF- β

Se han descrito dos importantes receptores de TGF- β : el receptor de TGF- β tipo I (TRI) y el de tipo II (TRII). Ambos son receptores transmembrana con actividad serina-treonina quinasa. El TGF- β se une al TRII induciendo un cambio conformacional, que le permite dimerizar con TRI e inducir su fosforilación, formando un complejo activo que transmite la señalización al interior celular^{99, 147, 160, 187}.

El TRI también se conoce como quinasa similar a la activina (ALK). Se han descrito siete ALKs en mamíferos¹⁸⁷. Las ALKs se han implicado en diferentes desórdenes, incluyendo tumorigénesis, telangiectasia hemorrágica (HHT), enfermedades inmunes y renales, y disfunciones esqueléticas, lo que sugiere que estos receptores se pueden usar como dianas terapéuticas⁶⁹. Las principales ALKs expresadas en el sistema vascular son las ALK1 y ALK5 y difieren en la ruta de señalización que utilizan. La ALK1 activa la de Smad1/5, mientras que la ALK5 activa la de Smad2/3. Las CE responden de manera opuesta al TGF- β , dependiendo de la ALK que utilicen, regulando la proliferación y la migración de las CE durante la angiogénesis. La ALK1, vía la ruta de Smad1/5, estimula la proliferación y la migración de las CE. Mientras que la ALK5 vía la ruta de Smad2/3 inhibe estos procesos¹¹⁸. Los estudios en los que se usan los ratones deficientes en ALK1 y ALK5 revelan funciones distintas en el desarrollo vascular. Los embriones deficientes en la ALK1 presentan lúmenes vasculares severamente dilatados, mientras que los deficientes en la ALK5 muestran un defecto en la formación de las monocapas de CMLV²¹⁹. En los vasos sanguíneos, la ALK1 se expresa sobre todo en el endotelio arterial y la ALK5 se localiza en las capas

media y adventicia de los vasos sanguíneos pero es indetectable en la capa íntima. En las células vasculares, incluyendo CE y CMLV, el receptor más abundante es el ALK5, siendo la ruta más comúnmente utilizada la de ALK5/Smad2/3. En un estudio reciente se ha observado que la inducción de ET-1 por TGF- β en EC es dependiente únicamente de la activación de ALK5, a través de las proteínas Smad3, indicando que las acciones antiangiogénicas del TGF- β en estas células están mediadas por ALK5³⁰. La investigación exhaustiva en el campo del TGF- β en los últimos años ha proporcionado información importante sobre la complejidad de las rutas de señalización del TGF- β que llevan a muy diferentes respuestas, como describieron Massagué y colaboradores en una excelente revisión¹⁴⁷.

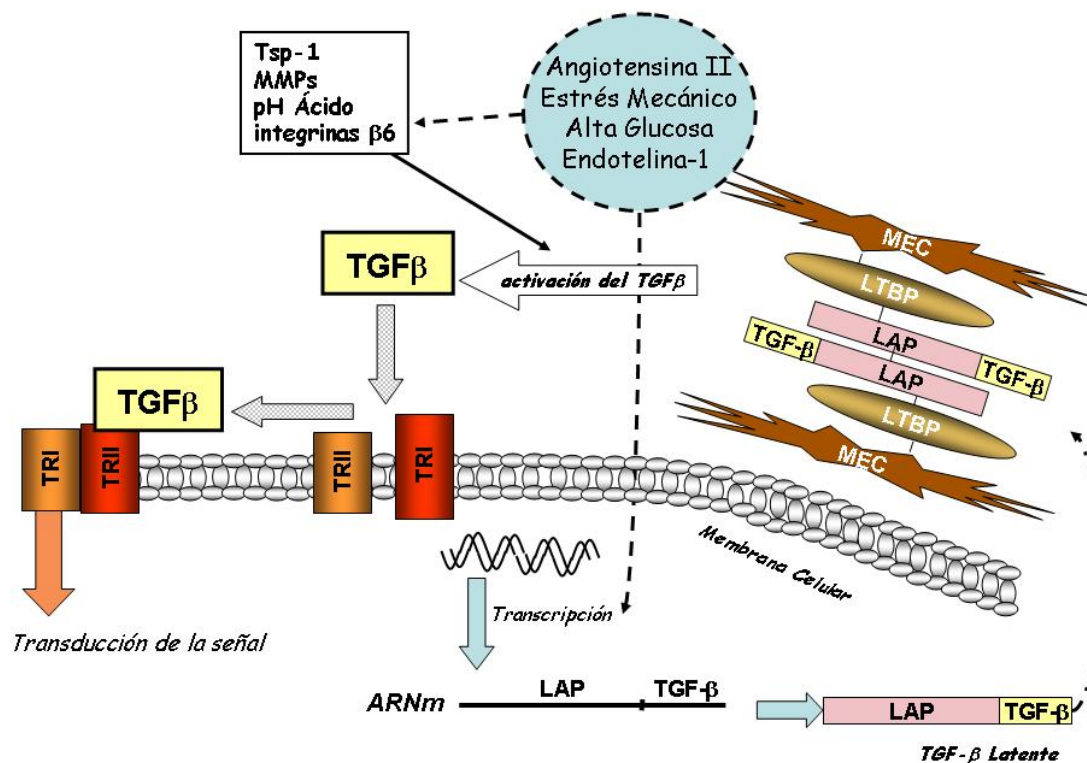


FIGURA 9. Regulación del TGF- β : esquema de la regulación del TGF- β desde su transcripción hasta la unión a sus receptores.

El TGF- β en la patología vascular.

El TGF- β participa en la patogénesis de muchas enfermedades cardiovasculares, como hipertensión, restenosis, aterosclerosis, hipertrofia cardíaca, e insuficiencia cardíaca (Fig 10). El TGF- β presenta efectos pleiotrópicos en células vasculares. Este factor de crecimiento puede regular tanto positiva como negativamente procesos implicados en proliferación celular, apoptosis, diferenciación y migración. En CMLV en cultivo, el TGF- β tiene un efecto dual en el crecimiento celular. En concentraciones bajas (<0.1 ng/ml), el TGF- β induce proliferación celular, mientras que en concentraciones altas inhibe la proliferación probablemente por la modulación de los niveles de los

receptores PDGF-A y PDGF-B ¹⁷. La complejidad de los efectos del TGF- β en el control del crecimiento aumenta cuando se combina con otros factores de crecimiento (i.e.: Ang II) ¹⁷.

La regulación de la diferenciación y el crecimiento celular de las CMLV es un proceso crítico para prevenir la proliferación asociada al daño vascular. En condiciones normales, las CMLV de la pared arterial presentan un fenotipo contráctil. Sin embargo, las CMLV conservan su habilidad para rediferenciarse a un fenotipo proliferativo, el cual está implicado en algunas enfermedades vasculares, tales como aterosclerosis y restenosis. Un aumento del TGF- β en la pared arterial se ha asociado a la formación de neointima²⁶⁸. En modelos experimentales, el bloqueo de TGF- β previene la formación de neointima en el remodelado restringido asociado a la angioplastia ²⁰⁴.

Otras importantes características del TGF- β son sus propiedades antiinflamatorias y profibróticas. En la aterosclerosis, el TGF- β se ha considerado una citoquina protectora ⁷⁰, ya que desarrolla un papel importante en el mantenimiento de la estructura normal de vaso y controla el balance entre la inflamación y la acumulación de MEC. La pérdida de este efecto protector, atribuido a cambios en los perfiles de los receptores de TGF- β y a modulaciones locales de los niveles del TGF- β , contribuye al desarrollo de la placa aterosclerótica. Los estudios realizados por Graiger y colaboradores apoyan esta hipótesis ⁷⁰. En la pared de los vasos normales, el receptor de tipo II es el más abundante. El TGF- β a través de este receptor aumenta la expresión de proteínas contráctiles, pero no la producción de proteínas de la MEC. En los vasos enfermos, el receptor de tipo I está sobreexpresado, por lo que el TGF- β estimula la producción de MEC, y puede promover la producción de la lesión temprana ⁷⁰. En modelos experimentales la ausencia de la señalización TGF- β 1 promueve el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas y de las placas inestables. El TGF- β presenta propiedades protectoras que se atribuyen a sus efectos en la inmunomodulación de las células más importantes para la formación de la lesión, incluyendo CE, CMLV, macrófagos y células T. Finalmente, el TGF- β puede estimular a las CMLV para producir colágeno, y por lo tanto contribuir a la estabilización de la placa. La hipertensión causa cambios estructurales en las arterias incluyendo hipertrofia de las CMLV, acumulación de colágeno y fibronectina, y destrucción de las fibras elásticas. La sobreproducción de MEC se ha atribuido a los cambios hemodinámicos asociados al estrés mecánico así como a los factores de crecimiento como el TGF- β . Evidencias recientes muestran que los ratones deficientes en Emilina1 (un inhibidor de la formación de TGF- β activo) tienen incrementada la presión arterial, la resistencia de la vasculatura periférica, y reducido el tamaño de los vasos indicando un papel potencial del TGF- β en la hipertensión ²⁶⁷.

El TGF- β y la fibrosis vascular.

El TGF- β se ha considerado como uno de los más importantes reguladores de la MEC ¹¹⁶. En las CMLV, CE y fibroblastos, el TGF- β 1 aumenta la síntesis de proteínas de la MEC, como fibronectina, colágenos y PAI-1, incluso a concentraciones bajas ^{116, 167}. El TGF- β induce la expresión de la forma ED-A de la fibronectina, la cual es necesaria para la producción de la actina de músculo liso (α -SMA), y la expresión del colágeno de tipo I ¹¹⁶. El PAI-1 es un inhibidor de proteasas de la clase serpin importante en

la remodelación tisular, debido a la restricción de la trombosis, inflamación y la regulación de la MEC. El TGF- β reduce la producción de colagenasas y estimula la expresión del inhibidor de las metaloproteinasas de tejido (TIMP), obteniendo como resultado la inhibición de la degradación de la MEC, lo que deriva en una excesiva acumulación de matriz ^{116, 241}. Los mecanismos implicados en la fibrosis vascular mediada por el TGF- β son complejos e incluyen la activación de las proteínas Smad, proteínas quinasas, e interacción entre diferentes rutas de señalización. Por otro lado, el TGF- β actúa como un mediador de la fibrosis vascular inducida por diversos factores implicados en las enfermedades cardiovasculares, como son el estrés mecánico, la Ang II, las altas concentraciones de glucosa y los productos terminales de glicación avanzada (AGEs) ^{122, 123, 202}. Por ahora no hay una terapia efectiva de las enfermedades fibróticas. El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la acumulación de MEC puede contribuir a una mejor comprensión de este proceso patológico y mejorar las terapias empleadas en la actualidad.

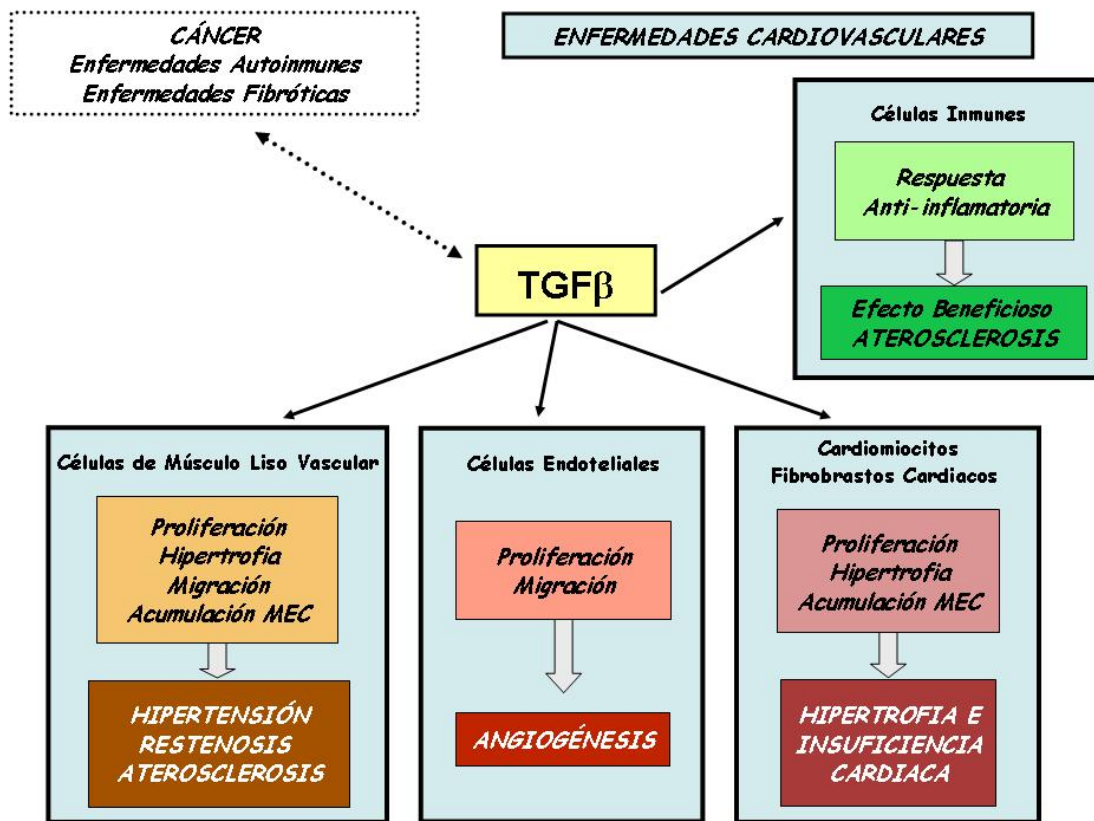


FIGURA 10. El TGF- β en la patología vascular. El TGF- β participa en las distintas respuestas implicadas en el daño vascular.

La señalización por las proteínas Smad.

Tras su activación, el TGF- β transmite su señal a través de la membrana mediante su unión a dos receptores (el TRI y el TRII) ^{104, 268}. El TGF- β se une al TRII, activa la quinasa del TRI, el cual a su vez fosforila las Smad reguladas por receptor (R-Smads), Smad2 y Smad3 en la serina C-terminal. Las R-Smad se disocian del complejo receptor para formar un complejo heterotrimérico con Smad4. Estos complejos se traslocan al núcleo y funcionan como reguladores transcripcionales de genes diana. La unidad inhibitoria Smad7 se une al receptor de tipo I activo, impidiendo la fosforilación de Smad2/3. También recluta las ligasas Smurf1 y Smurf2 para inducir la degradación proteosómica de los complejos del receptor ^{104, 268} (Fig 11).

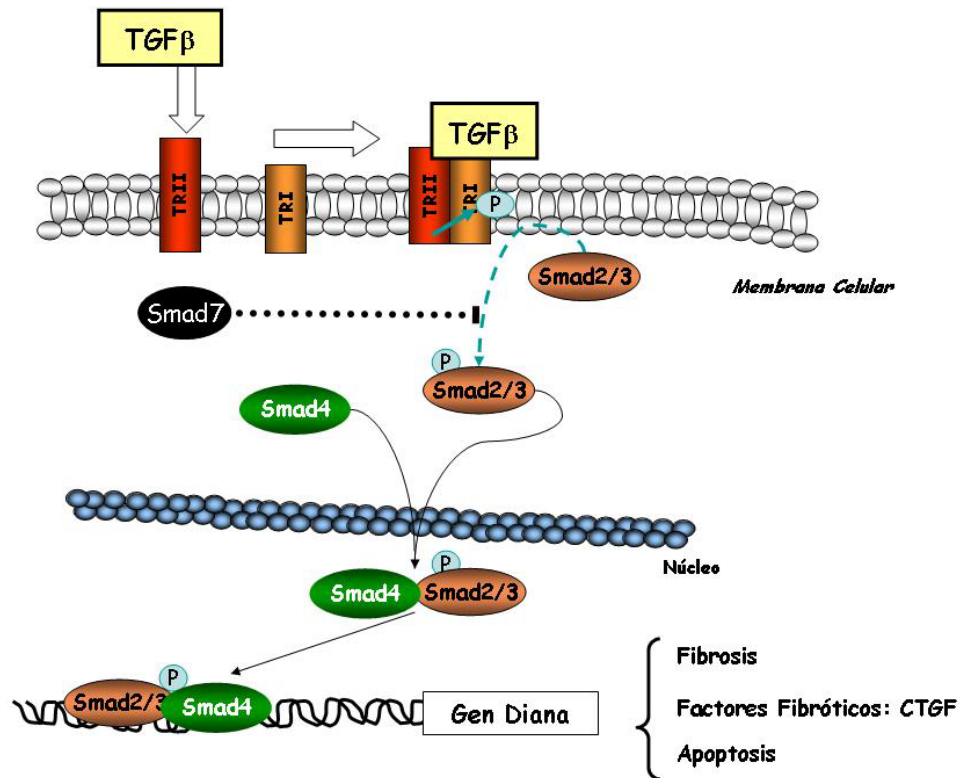


FIGURA 11. Señalización por TGF- β /Smad en CMLV. Esquema de la señalización desencadenada por TGF- β en CMLV donde la isoforma mayoritaria del TRI es la ALK5.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis fue estudiar los mecanismos implicados en la fibrosis vascular y su modulación farmacológica centrándonos en la regulación del el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) como nuevo mediador de la fibrosis vascular. El conocimiento de la regulación de este factor puede aportar ideas para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de las enfermedades vasculares.

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar si la Endotelina-1 (ET-1) regula CTGF en las células de músculo liso vascular (CMLV), y su papel potencial en la fibrosis, evaluando el subtipo del receptor (ET_A o ET_B) implicado así como los mecanismos intracelulares implicados en este proceso.
2. Determinar si existe una interacción entre la ET-1, la Angiotensina II (Ang II) y el factor transformador del crecimiento (TGF- β).
3. Profundizar en la relación entre Ang II y TGF- β , estudiando la ruta de las Smad.
4. Analizar la modulación farmacológica de estos procesos. Para ello utilizamos los inhibidores de la reductasa de la HMG-CoA por ser fármacos con efectos beneficiosos en el tratamiento de las enfermedades vasculares.

MÉTODOS Y RESULTADOS

MÉTODOS Y RESULTADOS

La Endotelina-1 aumenta CTGF, vía receptores ET_A, en células de músculo liso vascular.

En esta parte de la tesis desarrollamos el objetivo 1 y 2 planteado con anterioridad. Para ello se ha realizado el siguiente trabajo de investigación.

La ET-1 se une a receptores con siete dominios transmembrana asociados a proteínas G. Se han clonado cinco receptores distintos de ET. En mamíferos se expresan los receptores ET_A y ET_B y en ratas se ha descrito un receptor dual de angiotensinall (AngII)/ET-1 ^{10, 129, 197, 206, 207}. ET-1, principalmente vía ET_A, promueve vasoconstricción, crecimiento celular, adhesión celular, fibrosis y trombosis. El papel de los receptores ET_B es todavía controvertido. Se ha descrito que aquellos expresados en las células endoteliales también produce vasodilatación, liberación de NO, y previene de la apoptosis, y podría oponerse a las acciones del receptor ET_A ^{133, 185}. De hecho, en condiciones patológicas se ha observado en CMLV activación de ET_B, con una función similar a la de ET_A, con lo que podría amplificar las respuestas inducidas por ET-1 ⁸¹.

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) es una proteína secretable rica en cisteínas que regula proliferación/apoptosis celular, angiogénesis, migración, adhesión y fibrosis ¹¹⁵. CTGF se induce fuertemente por estrés mecánico o presión estática ^{87, 265}, y por varios factores implicados en el daño vascular, incluyendo concentraciones elevadas de glucosa, TGF- β , Ang II y VEGF, pero no por otros factores como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y PDGF, y se inhibe por cAMP y TNF- α ^{115, 203}. Sin embargo no existen estudios que analicen la posible regulación de CTGF por ET-1. En CMLV, CTGF regula proliferación/apoptosis celular, migración, síntesis de MEC ^{52, 115}, y media en los efectos profibróticos de Ang II ²⁰³. Algunos datos sugieren que CTGF y TGF- β colaboran de forma sinérgica para promover fibrosis crónica. En ratones, la co-inyección subcutánea de CTGF y TGF- β acaba en una fibrosis sostenida y persistente ¹⁵⁸, y CTGF actúa como mediador de la apoptosis y la fibrosis inducida por TGF- β ¹¹⁵. La acumulación de MEC es uno de las características de las enfermedades cardiovasculares. El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en este proceso sería muy útil en el tratamiento de estas enfermedades. La sobreexpresión de CTGF se ha descrito en lesiones ateroscleróticas humanas, infarto de miocardio, en los corazones de ratas hipertensas y en las aortas de ratas infundidas con Ang II asociadas a acumulación de MEC ^{31, 56, 174, 203}. En esta tesis hemos investigado si la ET-1 podía regular CTGF en CMLV y su papel potencial en la fibrosis, evaluando el subtipo del receptor implicado (ET_A y ET_B) así como los mecanismos intracelulares implicados en este proceso, evaluando la posible relación entre los principales factores que lo regulan como son Ang II y TGF- β .

Endothelin-1, via ET_A Receptor and Independently of Transforming Growth Factor- β , Increases the Connective Tissue Growth Factor in Vascular Smooth Muscle Cells

Juan Rodriguez-Vita, Marta Ruiz-Ortega, Mónica Rupérez, Vanessa Esteban, Elsa Sanchez-López, Juan José Plaza, Jesús Egido

Abstract—Endothelin (ET)-1 is a potent vasoconstrictor that participates in cardiovascular diseases. Connective tissue growth factor (CTGF) is a novel fibrotic mediator that is overexpressed in human atherosclerotic lesions, myocardial infarction, and experimental models of hypertension. In vascular smooth muscle cells (VSMCs), CTGF regulates cell proliferation/apoptosis, migration, and extracellular matrix (ECM) accumulation. Our aim was to investigate whether ET-1 could regulate CTGF and to investigate the potential role of ET-1 in vascular fibrosis. In growth-arrested rat VSMCs, ET-1 upregulated CTGF mRNA expression, promoter activity, and protein production. The blockade of CTGF by a CTGF antisense oligonucleotide decreased FN and type I collagen expression in ET-1-treated cells, showing that CTGF participates in ET-1-induced ECM accumulation. The ET_A, but not ET_B, antagonist diminished ET-1-induced CTGF expression gene and production. Several intracellular signals elicited by ET-1, via ET_A receptors, are involved in CTGF synthesis, including activation of RhoA/Rho-kinase and mitogen-activated protein kinase and production of reactive oxygen species. CTGF is a mediator of TGF- β - and angiotensin (Ang) II-induced fibrosis. In VSMCs, ET-1 did not upregulate TGF- β gene or protein. The presence of neutralizing transforming growth factor (TGF)- β antibody did not modify ET-1-induced CTGF production, showing a TGF- β -independent regulation. We have also found an interrelationship between Ang II and ET-1 because the ET_A antagonist diminished CTGF upregulation caused by Ang II. Collectively, our results show that, in cultured VSMCs, ET-1, independently of TGF- β and through the activation of several intracellular signals via ET_A receptors, regulates CTGF. This novel finding suggests that CTGF could be a mediator of the profibrotic effects of ET-1 in vascular diseases. (*Circ Res.* 2005;97:125-134.)

Key Words: endothelin-1 ■ connective tissue growth factor ■ signal transduction ■ vascular smooth muscle cells ■ extracellular matrix

Several data suggest an important role for endothelin-1 (ET-1) in vascular diseases. Elevated plasma and tissue levels of ET-1 have been described in atherosclerosis, myocardial infarction, unstable angina, pulmonary hypertension, and heart failure. Chronic exposure to ET-1 results in vascular and myocardial fibrosis and hypertrophy.^{1,2} In experimental models of cardiovascular damage, the treatment with ET-1 antagonists presented marked beneficial effects.¹⁻⁷

ET-1 is a potent vasoconstrictor that can activate vascular smooth muscle cells (VSMCs), inducing proliferation,⁸ hypertrophy,^{1,2} and synthesis of extracellular matrix (ECM) proteins, such as fibronectin (FN) and type I collagen.^{9,10} ET-1 stimulates the production of cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor-2,¹¹⁻¹⁴ and strengthens the effects of transforming growth factor (TGF)- β and platelet-derived growth factor (PDGF).¹⁵ Mammals possess two main receptors, ET_A and

ET_B.^{1,2} In blood vessels, ET_A receptors are found in VSMCs, whereas ET_B receptors are mainly localized on endothelial cells and, to some extent, in VSMCs and macrophages. ET-1, predominantly via ET_A receptors, promotes vasoconstriction, cell growth, adhesion, fibrosis, and thrombosis. However, the role of ET_B receptors is still controversial because those expressed on endothelial cells stimulate vasodilatation, release NO, and prevent apoptosis and may oppose the actions of ET_A receptors.^{1,2} Moreover, in pathological conditions, upregulation of ET_B on VSMCs has been described, with similar function to ET_A, which could amplify ET-1-induced responses.¹⁶

Connective tissue growth factor (CTGF) is a cysteine-rich secreted protein that regulates cell proliferation/apoptosis, angiogenesis, migration, adhesion, and fibrosis.¹⁷ CTGF expression is strongly upregulated by mechanical stress or static pressure and by several factors involved in vascular damage, including elevated glucose concentrations, TGF- β , angioten-

Original received May 10, 2004; resubmission received May 4, 2005; accepted June 13, 2005.

From the Vascular and Renal Research Laboratory, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma Madrid, Spain

Correspondence to Marta Ruiz-Ortega, PhD, Vascular and Renal Research Laboratory, Universidad Autónoma Madrid, Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid, Spain. E-mail mruizo@fdj.es

© 2005 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://www.circresaha.org>

DOI: 10.1161/01.RES.0000174614.74469.83

sin (Ang) II, and VEGF, but not by other factors, such as epidermal growth factor and PDGF, and is downregulated by cAMP and TNF- α .^{17,18} However, there are no studies investigating whether ET-1 could regulate CTGF expression. Accumulation of ECM is one feature of cardiovascular diseases. The elucidation of the molecular mechanisms involved in this process would be very useful in the treatment of these disorders. The correlation of CTGF overexpression with fibrosis has been described in human atherosclerotic lesions, myocardial infarction, and in the aorta of Ang II-infused rats.^{18–21} The aim of this study was to investigate whether ET-1 could regulate CTGF in vascular cells and to investigate the potential role of ET-1 in ECM accumulation. Next, we have also evaluated the receptor subtype (ET_A and ET_B) and the molecular mechanisms involved in this process. ET-1 triggers several intracellular signaling systems, including free oxygen radical production, and activation of small G proteins and mitogen-activated protein kinase (MAPK),^{22–24} which are involved in vascular damage and fibrosis. For this reason, we studied whether these signaling pathways participate in ET-1-mediated CTGF regulation. Some data suggest that CTGF and TGF- β synergizes to promote chronic fibrosis²⁵ and that CTGF acts as a mediator of TGF- β -induced apoptosis and fibrosis.¹⁷ In VSMCs, CTGF is also a mediator of the profibrotic effects of Ang II.¹⁸ Finally, we investigated the potential interrelationship of TGF- β , Ang II, and ET-1 on CTGF regulation.

Materials and Methods

Materials

Cell culture reagents (Life Technologies, Inc), Botulinum C3 exoenzyme (Calbiochem, La Jolla, Calif), ET-1 and antagonists (BACHEM, Germany), Y-27632 and fasudil (TOCRIS Cookson Ltd, Bristol, UK) were used. Antibodies were as follows: rabbit anti-CTGF antibody (Torrey Pines Biolabs, San Diego, Calif), phospho-ERK, ERK, and tubulin antibodies (Sigma) and secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology). The rest of the compounds were from Sigma-Aldrich.

Cell Cultures

VSMCs were obtained from thoracic aorta of Wistar-Kyoto rats by the collagenase method as described.²⁶ Wistar Kyoto rats were obtained from the animal facilities of the Fundación Jiménez-Díaz and were treated following Institutional and European guidelines. Subcultured VSMCs from passages 2 to 7 were used in the experiments, showed >99% positive immunostaining against smooth muscle α -actin antibodies. For subsequent experiments, cells at 80% confluence in culture wells were growth-arrested by serum-starvation for 48 hours.

Gene and Protein Studies

Total RNA was isolated with Trizol. Northern blot was performed as described.¹⁸ Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed on a ABI Prism 7500 sequence detection PCR system (Applied Biosystems) according to the protocol of the manufacturer. TGF- β , type I procollagen, and GAPDH assay identification numbers are as follows: Rn00579697_m1, Rn00584426_m1 and Rn99999916_m1. Protein levels were determined by Western blot¹⁸ and ELISA (TGF- β 1 immunoassay kit from R&D). Protein content was determined by the BCA method. For Western blot, Red Ponceau

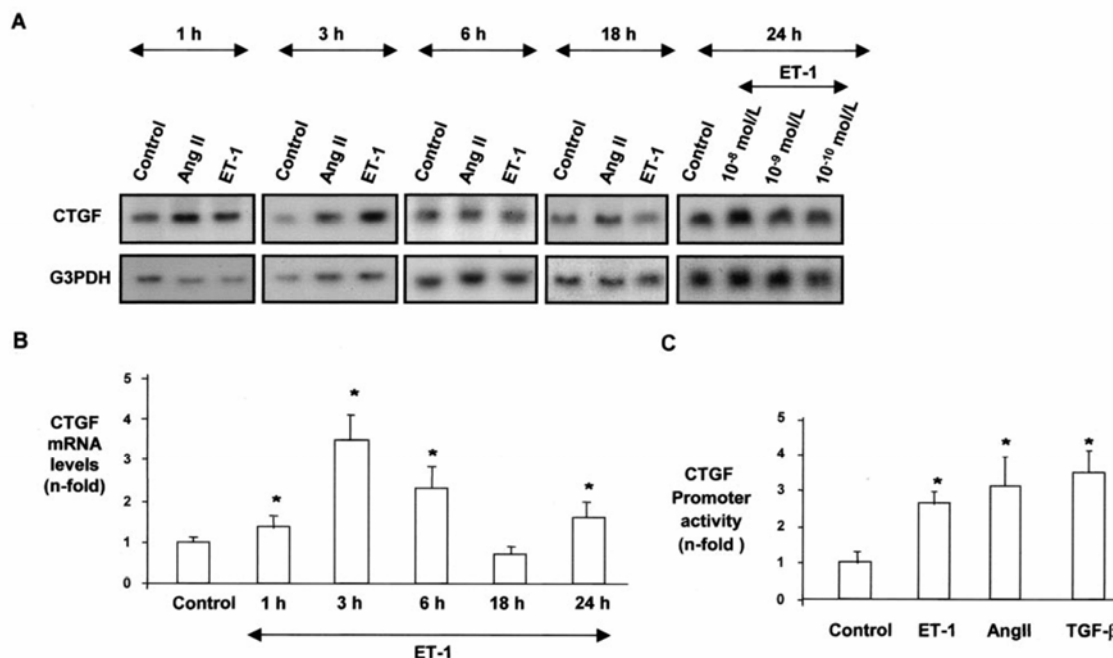


Figure 1. ET-1 increases CTGF mRNA expression in cultured VSMCs. **A**, Growth-arrested VSMCs were stimulated with 10^{-6} mol/L ET-1 or 10^{-7} mol/L Ang II from 1 to 24 hours. Dose response of ET-1 (10^{-6} mol/L to 10^{-10} mol/L) occurred at 24 hours. CTGF gene expression was determined by Northern blot, shown as a band of 2.4 kb. **A**, Representative Northern blot. **B**, mean \pm SEM values of 4 experiments. * $P < 0.05$ vs control. The quantification of CTGF mRNA was determined densitometrically and expressed as ratio CTGF/G3PDH as n-fold over control. **C**, ET-1 increases CTGF promoter activity in VSMCs. Cells were transiently transfected with a CTGF promoter/SEAP reporter expression vector and CMV- β -galactosidase and were treated 24 hours later with 10^{-6} mol/L ET-1, 10^{-7} mol/L Ang II, or 10 ng/mL TGF- β for 24 hours. Values are mean \pm SEM of 5 experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ vs control.

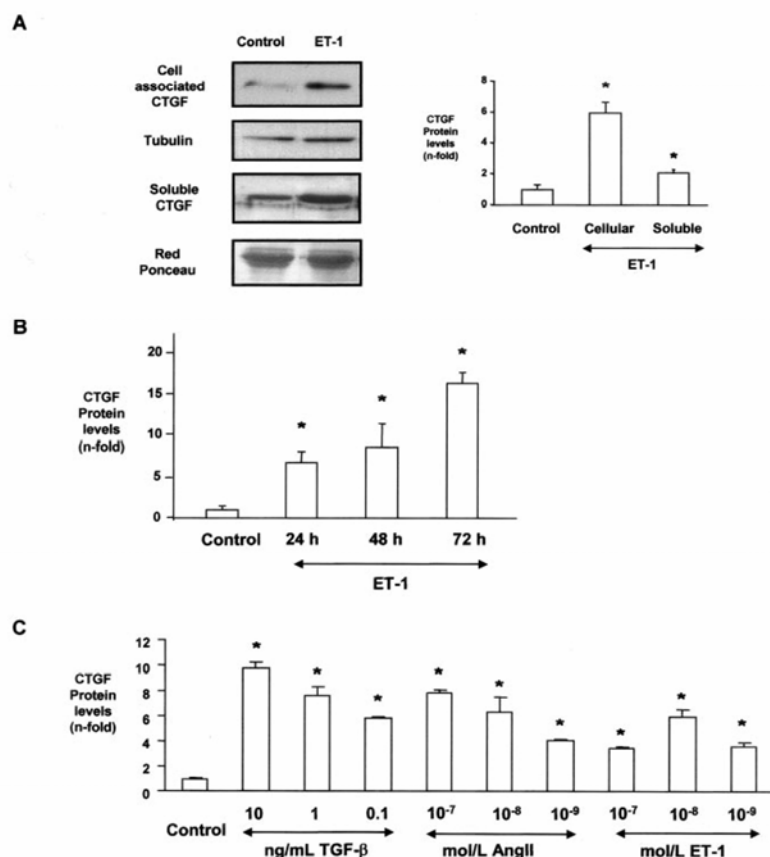


Figure 2. ET-1 increases CTGF production in VSMCs. Growth-arrested VSMCs were stimulated with 10^{-8} mol/L ET-1 for 24 hours. A, Representative Western blot of soluble and cell-associated CTGF (left), as shown by a band ≈ 38 to 42 kDa, and data of CTGF production as mean \pm SEM of 3 to 8 experiments (right). B, Time-course effect of ET-1. VSMCs were treated with 10^{-8} mol/L ET-1 for increasing times. C, Dose response of ET-1, Ang II, or TGF- β after 24 hours. B and C depict data of total CTGF production obtained from densitometric analysis and expressed as ratio CTGF/tubulin as n-fold over control of mean \pm SEM of 8 experiments. * $P < 0.05$ vs control.

staining was used to show quality of proteins and efficacy of protein transfer. In experiments of cell-associated proteins, tubulin was used as loading control. The autoradiographs were scanned using the GS-800 Calibrated Densitometer (Quantity One, Bio-Rad, Spain), obtaining densitometric arbitrary units. Data were normalized against those of the corresponding tubulin. Results are expressed as n-fold increase over control in densitometric arbitrary units, expressed as mean \pm SEM of the experiments performed.

Localization of RhoA was performed by indirect immunofluorescence with a rabbit polyclonal anti-RhoA antibody. Briefly, cells were fixed in merckofix (Merck) and treated with 0.1% Triton X-100. Nuclei were stained with propidium iodide (1 μ g/mL). Controls were stained with nonimmune serum or with the secondary antibody alone (not shown). Coverslips were mounted in mowiol and examined by a laser scanning confocal microscope (Leika).

Transfection and Promoter Studies

VSMCs were seeded in 6-well plates, and 24 hours later, cells were transiently transfected with FUGENE (Roche Molecular Biochemicals), 1 μ g CTGF promoter/SEAP reporter expression vector (kindly donated by Dr Noelynn Oliver, Fibrogen²⁷) and 0.25 μ g CMV- β -galactosidase (Clontech). After a 24-hour serum starvation step, cells were stimulated for 24 hours, and were assayed for SEAP/ β -galactosidase activity.

Statistical Analysis

Significance was established with GraphPAD Instat using Student t test (GraphPAD Software) and Wilcoxon and Student-Newman-Keuls tests. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Endothelin-1 Increases CTGF mRNA, Promoter Activity, and Protein Levels in VSMCs

Cultured VSMCs were treated with ET-1 for increasing times, and CTGF gene expression was determined by Northern blot. ET-1 upregulated CTGF mRNA expression as early as at 1 hour, peaking at 3 hours and remained elevated up to 24 hours. This CTGF upregulation was dose-dependent and maximal at 10^{-8} mol/L ET-1 (Figure 1).

Pretreatment with cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, strongly increased CTGF mRNA expression in basal and ET-treated cells at all times studied (not shown), suggesting that this gene is regulated at the transcriptional level. We assessed whether ET-1 activates CTGF promoter. We found that ET-1 potently increased CTGF promoter activity in VSMCs (Figure 1C). These data indicate that ET-1-induced CTGF upregulation is controlled primarily at the level of transcription.

We determined whether ET-1 regulates CTGF protein production by Western blot analysis. ET-1 increased cell-associated and soluble CTGF protein synthesis after 24 hours. The maximal response of ET-1 was found at 10^{-8} mol/L and maintained elevated up to 72 hours (Figure 2).

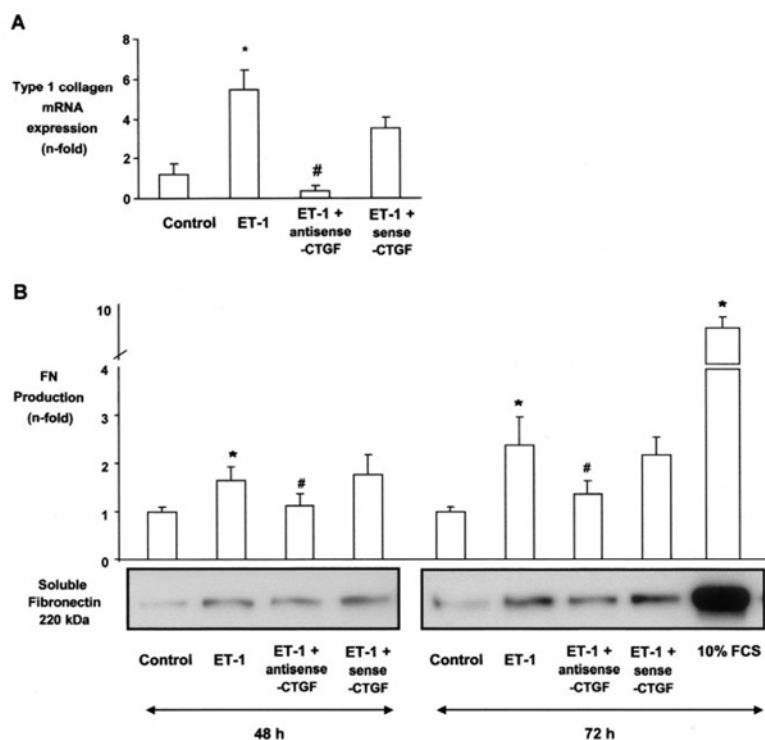


Figure 3. CTGF is involved in ET-1-induced ECM accumulation. VSMCs were treated with 10^{-8} mol/L ET-1 for different times. To block CTGF actions, a CTGF antisense oligonucleotide (OND) (20 μ g/mL) was added directly to the medium. As control, a CTGF sense oligonucleotide was used. A, Gene expression of type I collagen after 24 hours of stimulation evaluated by real-time PCR. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 experiments. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs ET-1. B, Soluble FN production are determined by Western blot. Representative Western blots are shown in the bottom panels; mean \pm SEM of 4 experiments are shown in the top panels. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs ET-1.

Role of CTGF in ET-1-Induced ECM Accumulation

We investigated whether CTGF was implicated in ET-1-induced ECM regulation. In VSMCs, CTGF increases ECM proteins, such as type I collagen and FN.²⁸ We blocked CTGF actions with a CTGF antisense oligonucleotide.¹⁸ Incubation with a CTGF antisense oligonucleotide decreased type I

collagen gene expression and FN production in ET-1-treated cells (Figure 3). These data suggest that CTGF is a downstream mediator of ET-1-induced ECM accumulation.

Endothelin-1 Increases CTGF via ET_A in VSMCs

We have studied the receptor involved using specific ET_A and ET_B antagonists. The ET_A antagonist BQ123 dose depen-

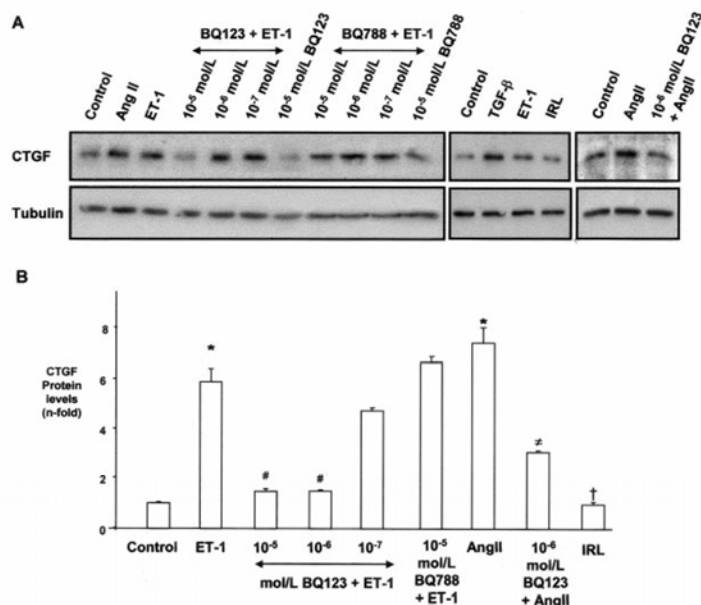


Figure 4. ET-1 increases CTGF protein levels via ET_A receptors in VSMCs. A, Cells were pretreated for 1 hour with BQ123 (ET_A antagonist) or BQ788 (ET_B antagonist) at 10^{-6} to 10^{-7} mol/L and then stimulated with 10^{-8} mol/L ET-1 or 10^{-7} mol/L Ang II for an additional 24 hours. Some cells were also treated with the ET_B agonist IRL-1620 (10^{-6} mol/L) or 10 ng/mL TGF- β . A, Representative Western blot. B, Total CTGF production, expressed as mean \pm SEM of 6 experiments. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs ET-1, † $P =$ n.s. vs control, # $P < 0.05$ vs AngII.

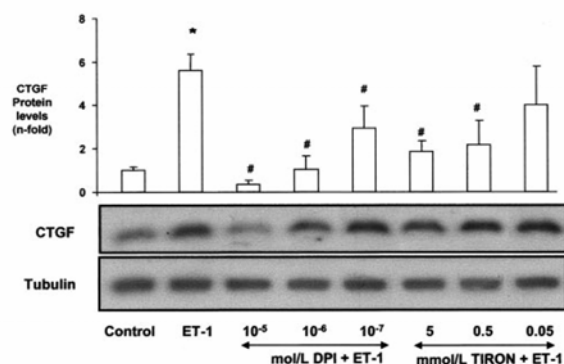


Figure 5. Antioxidants diminished ET-1-induced CTGF. Cells were preincubated for 1 hour with the antioxidants (diphenyleneiodonium DPI: 10^{-5} to 10^{-7} mol/L; Tiron: 5 to 0.05 mmol/L) and then treated with 10^{-6} mol/L ET-1 for 24 hours and studied by Western blot. Bottom, Representative Western blot. Top, Data of mean \pm SEM of 6 experiments. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs ET-1.

dently diminished ET-1-induced CTGF production, whereas the ET_B antagonist BQ 788 had no effect (Figure 4). The ET_B agonist IRL-1620 did not increase CTGF synthesis (Figure 4). The ET_A antagonist BQ123 diminished ET-1-induced CTGF mRNA upregulation from 3 to 24 hours (not shown). These data suggest that ET-1-induced CTGF upregulation is mediated through ET_A receptors.

Molecular Mechanisms Involved in ET-1-Induced CTGF Upregulation

Role of Antioxidants in ET-1-Induced CTGF

The NADH/NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium (DPI) and the O₂^{•-} scavenger Tiron markedly diminished, in a dose-dependent manner, ET-1-induced CTGF protein production (Figure 5), showing that ET-1 regulates CTGF through a redox-sensitive mechanism.

Role of Small G proteins on CTGF Regulation Caused by ET-1

Exoenzyme Clostridium Botulinum C₃ causes ADP-ribosylation at Asn41 of Rho, which is located in the putative effector domain of Ras-related GTP-binding proteins, and then results in specific inactivation of Rho.²⁹ Treatment of VSMCs with 5 μ g/mL of C₃ exoenzyme for 48 hours, which inhibits Rho GTPase activity, significantly attenuated CTGF production stimulated by ET-1 (Figure 6A), suggesting a role of the small G protein RhoA in this process. In unstimulated VSMCs, RhoA is located in the cytoplasm, and treatment with ET-1 for 10 minutes changed the distribution pattern to a membrane localization, indicating RhoA activation (indirect immunofluorescence, Figure 6B).

Rho kinase is a downstream target of RhoA. We tested the effect of selective inhibitors of the serine/threonine kinases ROCK I and II, Y-27632 and fasudil,³⁰ on CTGF production. Both Rho-kinase inhibitors dose dependently suppressed ET-1-induced CTGF gene and protein production (Figure 6C and D). These data show that activation of RhoA/Rho kinase pathway participates in CTGF regulation by ET-1.

Role of MAPK Activation in ET-1-Induced

CTGF Production

Pretreatment of VSMCs with the extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor, PD98059, markedly diminished ET-1-induced CTGF production, whereas the p38 MAPK inhibitor, SB203580, had no effect (Figure 7A), indicating the role of MAPK/ERK pathway in CTGF regulation. We next investigated the involvement of reactive oxygen species (ROS) production and Rho activation in ET-1-induced MAPK activation, evaluating ERK phosphorylation. VSMCs were treated with antioxidants and Rho-kinase inhibitors before stimulation with ET-1. Both treatments partially diminished ERK phosphorylation (Figure 7B). The involvement of ROS generation in mediating the ET-1 response on ERK has also recently described in A-10 VSMCs.³¹ These data suggest that regulation of CTGF by ET-1 involved first activation of Rho and production of ROS and then activation of MAPK/ERK pathway (Figure 7C).

ET-1 Regulates CTGF Independently of TGF- β but Both Factors Synergize in CTGF Production

In rat VSMCs, TGF- β is a potent activator of CTGF promoter and protein synthesis, showing a higher response than ET-1 (Figures 1 and 2). TGF- β is a mediator of CTGF upregulation and ECM accumulation caused by several factors involved in vascular fibrosis, such as Ang II and high glucose.^{17,18,32} In several models of cardiovascular diseases, the blockade of ET-1 receptors diminished tissue TGF- β expression^{1,2,7}; however, there are no studies evaluating whether ET-1 directly regulates TGF- β in vascular cells. Incubation of rat VSMCs with ET-1 did not increase TGF- β gene expression, studied until 24 hours. In addition, TGF- β content in conditioned media from ET-1-treated cells was not increased compared with unstimulated cells. In the presence of a neutralizing antibody against TGF- β , ET-1-induced CTGF production was not modified (Figure 8). Interestingly, we observed that cocubation of ET-1 and TGF- β resulted in a synergistic effect on CTGF production (Figure 8). These data indicate that ET-1 regulates CTGF by a TGF- β -independent mechanism.

Interrelationship Between Ang II and ET-1

In rat VSMCs, Ang II and ET-1 increased CTGF gene expression with a similar kinetic response. Both peptides increased CTGF promoter activity and protein production in a comparable manner, although the effect of Ang II was slightly higher, showing that this peptide is a more potent profibrotic factor (Figure 1C and 2C). Several data suggest that some actions of Ang II are attributable to the endogenous production of ET-1.^{33,34} We found that the ET_A antagonist BQ123 partially diminished Ang II-induced CTGF production (Figure 4), suggesting that ET-1 is involved in CTGF upregulation caused by Ang II.

Discussion

Many studies have demonstrated that ET-1 contributes to vascular structural changes in proliferative cardiovascular disease. Our results clearly show that in cultured VSMCs, ET-1 increases CTGF mRNA expression, promoter activity,

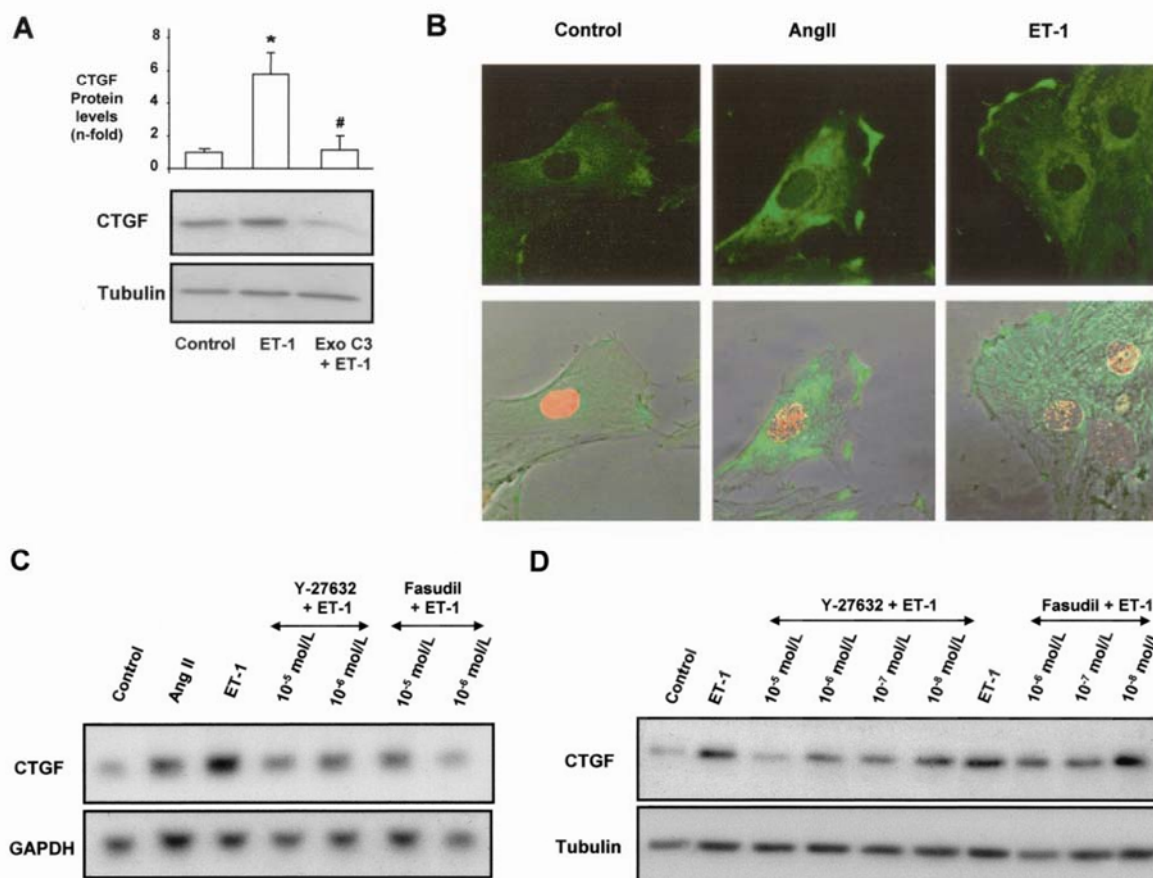


Figure 6. Role of small G proteins in CTGF production caused by ET-1. **A**, VSMCs were pretreated with C₃ exoenzyme (5 μ g/mL) for 48 hour, and then stimulated with 10⁻⁸ mol/L ET-1 for 24 hour. A representative Western blot and data of mean \pm SEM of 3 experiments are shown. * P <0.05 vs control, # P <0.05 vs ET-1. **B**, ET-1 activates RhoA in VSMCs. Cells were treated with 10⁻⁸ mol/L ET-1 or 10⁻⁷ mol/L Ang II for 10 minutes. Cells were stained with anti-RhoA antibody (top panels). Bottom panels show merge of RhoA immunostaining, nuclear staining with propidium iodide, and phase-contrast images of the corresponding fluorescence images. Results are representative of 3 independent observations. **C**, Effect of Rho-kinase inhibition on CTGF regulation. VSMCs were preincubated for 1 hour with Y-27632 or fasudil (10⁻⁵ mol/L and 10⁻⁶ mol/L) and then treated with 10⁻⁸ mol/L ET-1 for 3 (**C**) or 24 (**D**) hours. **C**, Northern blot of 4 performed. **D**, Western blot of 4 performed.

and protein production. ET-1 is a vasoactive and mitogenic agent for VSMCs and contributes to the accumulation of ECM through the regulation of FN and type I collagen.^{1,2,9,10} CTGF induces the synthesis of these ECM proteins and plays a key role in the pathogenesis of fibrosis.¹⁷ In experimental models of vascular damage, including atherosclerosis and hypertension, tissue ET-1 and CTGF upregulation was correlated with fibrosis.^{18–21} We have observed that ET-1 causes a maintained CTGF protein production, up to 72 hours, and the blockade of endogenous CTGF, with a CTGF antisense oligonucleotide, diminishes ET-1-induced FN and type I collagen expression. These data suggest that CTGF could be a mediator of ECM accumulation caused by ET-1.

ET-1 acts through two receptors, ET_A and ET_B, both of them expressed in VSMCs.^{1,2} The ET_A antagonist BQ123 significantly inhibited the in vitro growth-stimulating effects of ET-1.^{9,15} However, in pathophysiological states, such as hypercholesterolemia, the overall effect of ET_B

receptor activation may be vasoconstriction, amplifying ET-1-induced responses.¹⁶ In cultured fibroblasts, both receptors, ET_A and ET_B, mediate collagen synthesis.³⁵ In VSMCs, with specific ET_A and ET_B antagonists and agonist, we have observed that ET-1 upregulates CTGF gene and protein via ET_A receptors.

Much data indicate that ET-1 participates in atherosclerosis. In VSMCs of normal and diseased aorta, dense binding of ET-1 was observed by autoradiography. High expression levels of ET-1 have been found in human atherosclerotic plaques compared with normal vessels and after coronary angioplasty.^{36,37} ET-1 release is stimulated by vessel injury and by atherogenic oxidized low-density lipoproteins even when the endothelium remains intact.⁴ ET-1 plasma levels are \approx 1 to 2 pg/mL,² and tissue levels are increased during vascular damage.^{1,2} Our studies show that in cultured VSMCs, ET-1 at 10⁻⁸ mol/L increases CTGF mRNA and protein expression, suggesting that local

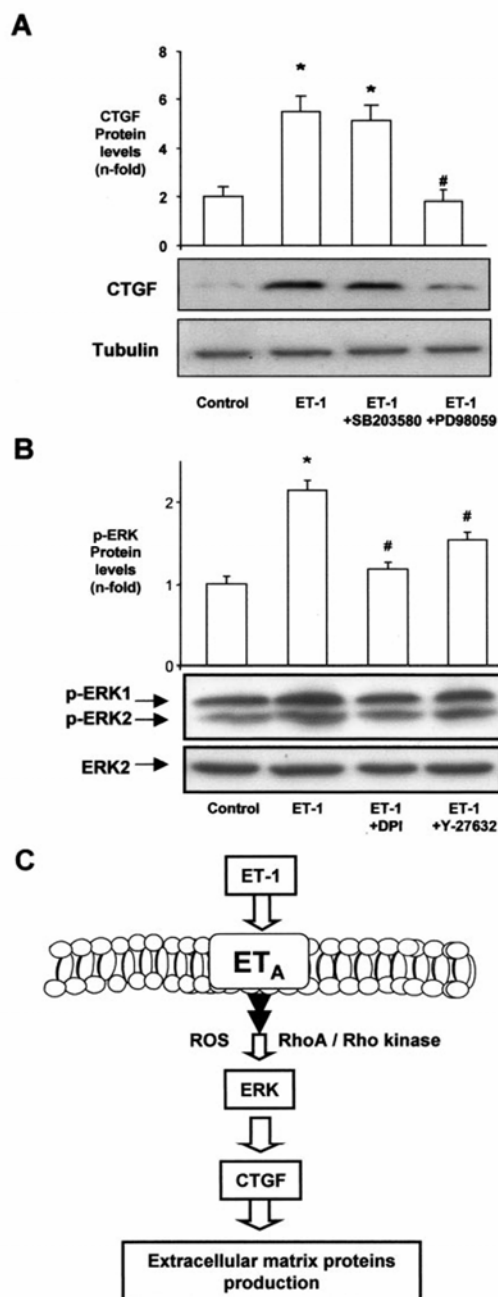


Figure 7. Role of MAPK activation in ET-1-induced CTGF production. **A**, Cells were preincubated for 1 hour with 10^{-6} mol/L SB203580 (p38 inhibitor), 2×10^{-5} mol/L PD98059 (ERK p42/44 inhibitor), and then treated with 10^{-6} mol/L ET-1 for 24 hours. **B**, ET-1 activates ERK via ROS and Rho-kinase pathways. Cells were preincubated for 1 hour with DPI or Y-27632 (10^{-5} mol/L) before ET-1 treatment for 20 minutes. Representative Western blot of CTGF (**A**) and p-ERK1/2 and ERK2 (**B**) are shown in the bottom panels; data of protein levels as mean \pm SEM of 3 experiments are shown in the top panels. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs ET-1. **C**, Scheme of the molecular mechanisms involved in ET-1-induced ECM production. In VSMCs, after binding to ET_A receptors, ET-1 activates several intracellular signals, such as RhoA/Rho-kinase pathway and production of

ET-1 production in injured vessels could contribute to ECM accumulation, through CTGF production by VSMCs. ET_A antagonism inhibits neointimal hyperplasia after both balloon and stent injury, by attenuating the proliferation of adventitial myofibroblasts and VSMCs as well as ECM formation.⁵ Moreover, ET_A blockade decreases the development of atherosclerosis in experimental hypercholesterolemia⁶ and in apolipoprotein E-deficient mice.³ In diabetic rats, ET_A antagonist diminished vascular hypertrophy and FN production.⁷ These data show that ET-1 via ET_A regulates trophic and fibrotic responses in vascular diseases.

ET-1 seems to be involved in human and experimental hypertension.³⁸ The $ET_{A/B}$ antagonist bosentan induced blood-pressure reductions in mildly hypertensive patients similar to those achieved with an angiotensin-converting enzyme inhibitor.³⁸ In different models of experimental hypertension vascular ET-1 overexpression and ECM accumulation have been described. In deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt-induced hypertension, ET_A antagonists ameliorated interstitial and perivascular fibrosis, whereas the ET_B protects against vascular and renal injuries.³⁹ In the early phase of this model, ET-1, via ET_A receptor, activates TGF- β_1 and increases FN and collagen deposition in the heart.⁴⁰ The effects of ET-1 antagonists may be attributable to the blockade of direct ET-1 actions on VSMCs. In this sense, we have observed that ET-1 activates VSMCs to produce CTGF that mediates overexpression of FN and type I collagen. Our data reveal a novel mechanism that could explain the beneficial effects of ET_A blockade in hypertension and other cardiovascular diseases.

Free radicals and redox stress participate in cellular signaling and regulate a number of important cellular events, including fibrosis and atherogenesis.⁴¹ ET-1 can induce ROS production in different cell types.^{1,2} In DOCA-salt hypertension, ROS generation was decreased by ET_A blockade.⁴² In low-renin mineralocorticoid hypertension ET-1 augments vascular superoxide production, at least in part, via an ET_A /NADPH oxidase pathway.⁴³ We examined the effect of DPI, a potent inhibitor of flavonoid-containing enzymes, such as NAD(P)H oxidase and the O^{2-} scavenger Tiron. Both antioxidants inhibited ET-1 stimulation of CTGF production, which suggests the involvement of a redox mechanism in the regulation of CTGF.

ET-1 activates several intracellular mediators, including small G proteins.^{1,2} The Rho family of GTP-binding proteins contains many geranylgeranylated proteins, such as Rho, Rac, and Cdc42, that play an important role in cell adhesion, actin dynamics, and gene transcription regulation, including ET-1 and cytokines.⁴⁴ In VSMCs, we have confirmed that ET-1 activates RhoA. Inhibition of RhoA activity, by C3 exotransferase, or of the downstream

ROS, both involved in ERK phosphorylation, which regulates CTGF production. This pathway triggers the production of fibronectin and type I collagen, showing that CTGF is mediator of ET-1-induced fibrosis.

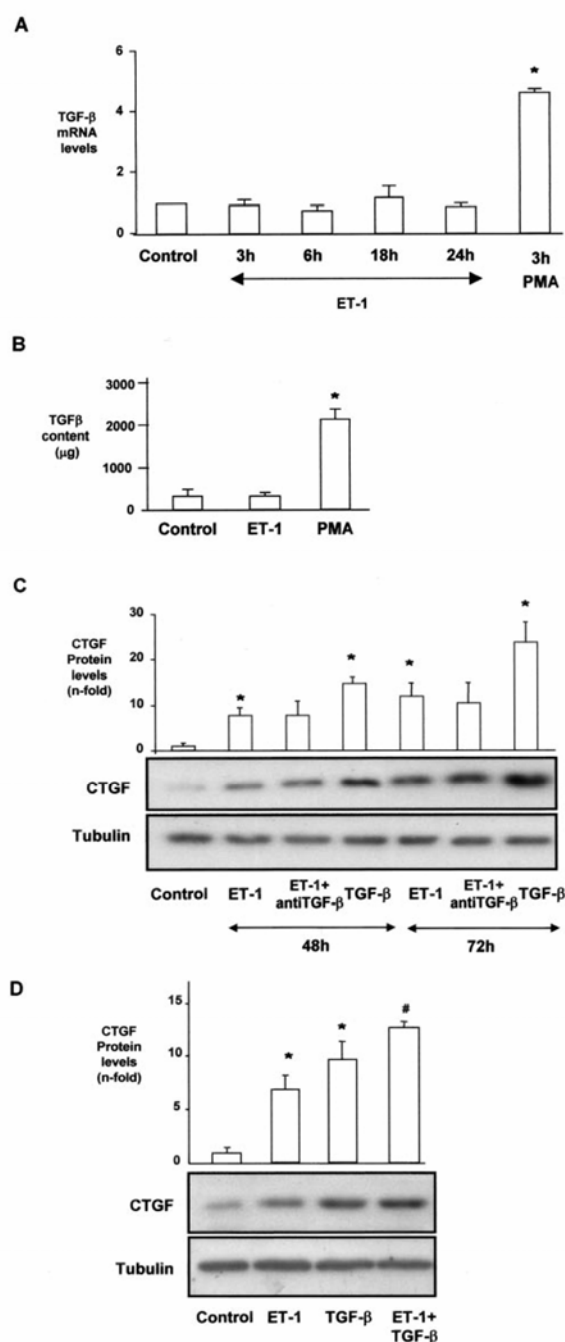


Figure 8. ET-1 did not increase TGF- β gene expression (A) and protein production (B) in VSMCs. Cells were treated with 10^{-8} mol/L ET-1 or 10^{-7} mol/L PMA. Gene levels were measured by real-time PCR. Total TGF- β content was determined by ELISA in conditioned media of treated cells for 24 hours. Data of mean \pm SEM of 3 experiments are shown. * $P < 0.05$ vs control. C, ET-1 regulates CTGF independently of TGF- β . Cells were preincubated with TGF- β neutralizing antibody ($10 \mu\text{g/mL}$) for 1 hour and then incubated with 10^{-8} mol/L ET-1. D, ET-1 and TGF- β synergizes on CTGF production. VSMCs were incubated with ET-1 or 10 ng/mL TGF- β alone or simultaneously for 24 hours. A representative Western blot and data of mean \pm SEM of 3 experiments are shown. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs TGF- β .

Rho-kinase, by Y27632 or fasudil, prevented the induction of CTGF by ET-1. In *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced vascular damage, Y-27632 decreased vascular inflammation and arteriosclerosis progression.⁴⁵ Activation of Rho-kinase system caused vasoconstriction, and it has been found in hypertensive animals.⁴⁶ Our results showing that ET-1, via Rho/Rho-kinase activation, upregulates CTGF support the importance of this signaling pathway in hypertension-induced vascular changes.

ET-1 stimulates MAPK pathway including the ERK cascade, the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase cascade, and the p38 MAPK cascade. These pathways have been implicated in differentiation, hypertrophy, and fibrosis.⁴⁷ We have observed that ERK, but not p38 activation, is necessary for ET-1-induced CTGF production. We have also found that ROS generation and Rho-kinase activation mediates ERK phosphorylation, indicating that CTGF production is induced by a ROS and Rho kinase-dependent ERK activation.

In cultured VSMCs, cyclic mechanical stretching and growth factors, such as TGF- β , Ang II and, as we have shown here, ET-1, upregulate CTGF.¹⁷ The regulation of CTGF can be mediated by the production of endogenous growth factors. In VSMCs, TGF- β mediates Ang II-induced CTGF production.¹⁸ Several data suggest an interrelation between TGF- β and ET-1. The blockade of ET-1 receptors diminished TGF- β production in cardiac, vascular, and renal tissues.^{7,33,48} TGF- β induces ET-1 synthesis.³² However, we have noted that in rat VSMCs ET-1 did not produce TGF- β . Moreover, the blockade of endogenous TGF- β did not decrease ET-1-induced CTGF upregulation. These data clearly indicate that ET-1 increases CTGF production independently of TGF- β . Current strategies designed to block fibrosis are focusing on CTGF, better than TGF- β , because of its specific role in ECM regulation, without affecting the inflammatory response, as occurs with TGF- β .⁴⁹ Our data, showing that ET-1 regulates CTGF and fibrosis independent of TGF- β , support the searching for CTGF-related antifibrotic therapies.

Ang II and ET-1 shares some cellular responses, such as vasoconstriction, cell proliferation and ECM accumulation. However, our data show a different role for TGF- β in the regulation of CTGF caused by both peptides. Ang II regulates the production of ET-1 by a redox-sensitive ERK pathway.⁵⁰ We have observed that the ET_A antagonist BQ123 diminished Ang II-induced CTGF production, suggesting that ET-1 mediates, at least in part, CTGF production caused Ang II.

Our data, showing that ET-1 upregulated CTGF up to 72 hours, and coinubation of ET-1 and TGF- β causes a synergistic production of CTGF, support the idea that this growth factor contributes to the perpetuation of fibrosis. In a model of skin fibrosis, CTGF mRNA levels remained elevated in areas of persistent fibrosis.²⁵ Injection of CTGF into the skin induces the formation of fibrous tissue and coinjection of CTGF and TGF- β results in sustained fibrosis.²⁵

Our results reveal that in cultured rat VSMCs, ET-1 via ET_A receptors increases CTGF and ECM production. The molecular mechanisms of CTGF regulation are complex, implicating the activation of several intracellular signals (redox processes, RhoA/Rho kinase, and MAPK/ERK) and the interrelationship with other growth factors systems (TGF- β and Ang II). Our findings suggest that CTGF could be a mediator of the profibrotic effects of ET-1 in vascular diseases and support the idea of the usage of CTGF blockers as a novel therapy for vascular diseases.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria FIS (PI020513, 01/3130 PI020822), Comunidad Autónoma de Madrid (08.4/0018/2001; 08.4/0021/2003), Red Cardiovascular (MP04), Fundación Renal Iñigo Alvarez de Toledo and European Project (QLG1-CT-2002-01215). J.R.-V., E.S.-L., M.R., and V.E. are fellows of FIS. We thank Mar Gonzalez Garcia-Parreño for technical help with the confocal microscopy.

References

1. Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists. Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*. 2000;102:2434–2440.
2. Rich S, McLaughlin VV. Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation*. 2003;108:2184–2190.
3. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14367–14372.
4. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AWA, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res*. 1992;70:1191–1197.
5. Best PJ, McKenna CJ, Hasdai D, Holmes DR Jr, Lerman A. Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation*. 1999;99:1747–1752.
6. McKenna CJ, Burke SE, Opgenorth TJ, Padley RJ, Camrud LJ, Camrud AR, Johnson J, Carlson PJ, Lerman A, Holmes DR Jr, Schwartz RS. Selective ET_A receptor antagonism reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model. *Circulation*. 1998;97:2551–2556.
7. Fukuda G, Khan ZA, Barbin YP, Farhangkhoei H, Tilton RG, Chakrabarti S. Endothelin mediated remodeling in aortas of diabetic rats. *Diabetes Diabetes Metab Res Rev*. 2004;21:367–375.
8. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1988;238:249–252.
9. Rizvi MA, Katwa L, Spadone DP, Myers PR. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:243–252.
10. Hahn AW, Regenass S, Kern F, Buhler FR, Resink TJ. Expression of soluble and insoluble fibronectin in rat aorta: effects of angiotensin II and endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;192:189–197.
11. Ruettgen H, Thiemermann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *Physiol Pharmacol*. 1997;48:675–688.
12. Agui T, Xin X, Cai Y, Sakai T, Matsumoto K. Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells. *Blood*. 1994;84:2531–2538.
13. Matsumura A, Yamochi W, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension*. 1998;32:89–95.
14. Peifley KA, Winkles JA. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242:202–208.
15. Yang Z, Krasnici N, Lüscher TF. Endothelin-1 markedly potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation*. 1999;100:5–8.
16. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ET_A and ET_B receptors mediate vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation*. 1995;92:357–363.
17. Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet*. 2004;363:62–64.
18. Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egidio J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation*. 2003;108:1499–1505.
19. Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, Marz W, Rupp J, Pech M, Luscher TF. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation*. 1997;18:831–839.
20. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF-beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:1805–1819.
21. Finckenberg P, Lassila M, Inkinen K, Pere AK, Krogerus L, Lindgren L, Mervaala E, Vapaatalo H, Nurminen ML, Ahonen J. Cyclosporine induces myocardial connective tissue growth factor in spontaneously hypertensive rats on high-sodium diet. *Transplantation*. 2001;71:951–958.
22. Fei J, Viedt C, Soto U, Flising C, Jahn L, Krenzer J. Endothelin-1 and smooth muscle cells induction of Jun amino-terminal kinase through an oxygen radical-sensitive mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1244–1249.
23. Lan C, Das D, Wloskiewicz A, Vollrath B. Endothelin-1 modulates hemoglobin-mediated signaling in cerebrovascular smooth muscle via RhoA/Rho kinase and protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H165–H173.
24. Yamboliev IA, Hruby A, Gerthoffer WT. Endothelin-1 activates MAP kinases and c-Jun in pulmonary artery smooth muscle. *Pulm Pharmacol Ther*. 1998;11:205–208.
25. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor beta in persistent fibrosis: a mouse model of fibrosis. *J Cell Physiol*. 1999;181:153–159.
26. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egidio J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor κ B through AT1 and AT2 receptors in cultured vascular smooth muscle cells. Molecular mechanisms. *Circ Res*. 2000;23:1266–1272.
27. Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000;275:15220–15225.
28. Fan WH, Pech M, Karnovsky MJ. Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration in vitro. *Eur J Cell Biol*. 2000;79:915–923.
29. Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S. Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*. 1989;264:8602–8605.
30. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol*. 2000;57:976–983.
31. Daou GB, Srivastava AK. Reactive oxygen species mediate endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:208–215.
32. Gonzalez W, Chen Z, Damon DH. Transforming growth factor-beta regulation of endothelin expression in rat vascular cell and organ cultures. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;37:219–226.
33. Fakhouri F, Placier S, Ardaillou R, Dussanle JC, Chatziantoniou C. Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal cortex and aorta of transgenic mice through interaction with endothelin and TGF-beta. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2701–2710.
34. Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238:861–865.

35. Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1993;27:2130–2134.
36. Bacon CR, Cary NRB, Davenport AP. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta. *Circ Res*. 1996;79:794–801.
37. Hasdai D, Holmes DR Jr, Garratt KN, Edwards WD, Lerman A. Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. *Circulation*. 1997;95:357–362.
38. Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension*. 1999;34:876–881.
39. Matsumura Y, Hashimoto N, Taira S, Kuro T, Kitano R, Ohkita M, Oppenorth TJ, Takaoka M. Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in the pathogenesis of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *Hypertension*. 1999;33:759–765.
40. Ammarguella FZ, Gannon PO, Amiri F, Schiffrin EL. Schiffrin fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ETA receptors. *Hypertension*. 2002;39:679–684.
41. Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*. 1995;25:155–161.
42. Callera GE, Touyz RM, Teixeira SA, Muscara MN, Carvalho MH, Fortes ZB, Nigro D, Schiffrin EL, Tostes RC. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. *Hypertension*. 2003;42:811–817.
43. Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, Chen AF. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin- η_1 -NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*. 2003;107:1053–1058.
44. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 1997;11:2295–2322.
45. Kataoka C, Egashira K, Inoue S, Takemoto M, Ni W, Koyanagi M, Kitamoto S, Usui M, Kaibuchi K, Shimokawa H, Takeshita A. Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension*. 2002;39:245–250.
46. Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, Isaka N, Hartshorne DJ, Nakano T. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res*. 2003;92:411–418.
47. Kolch W, Calder M, Gilbert D. When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Lett*. 2005;579:1891–1895.
48. Fraccarollo D, Galuppo P, Bauersachs J, Erdl G. Collagen accumulation after myocardial infarction: effects of ETA receptor blockade and implications for early remodeling. *Cardiovasc Res*. 2002;54:559–567.
49. Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:399–404.
50. Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, Cheng TH. Angiotensin II induces endothelin 1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2004;61:159–168.

La Ang II activa la ruta de señalización de las Smad mediante un mecanismo independiente de TGF- β , en células de músculo liso vascular.

En esta parte de la tesis desarrollamos el objetivo 3. Para ello se ha realizado el siguiente estudio. La fibrosis vascular es una de las principales características de las enfermedades cardiovasculares, incluida la hipertensión ²³⁴. Las proteínas Smad son componentes esenciales de la ruta de señalización intracelular del TGF- β , y participan en la fibrosis inducida por TGF- β ²³¹. El TGF- β es uno de los principales factores que regulan la fibrosis vascular. Concretamente inducen la acumulación de proteínas de la MEC, como la fibronectina (FN), el colágeno tipo I y el inhibidor del activador de plasminogeno-1 (PAI-1) en CMLV. Por lo tanto, juega un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ¹⁶⁹.

La Angiotensina II (AngII) regula el crecimiento celular, la inflamación y la fibrosis, contribuyendo a la progresión del daño vascular ^{202, 234}. Se ha descrito la relación entre la AngII y el TGF- β . En diferentes situaciones patológicas y tipos celulares. La AngII regula la expresión de TGF- β , el cual a su vez puede modular algunas respuestas de la AngII ^{21, 202, 234}. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los antagonistas del receptor AT1 disminuyen la expresión tisular del TGF- β y la fibrosis, y el bloqueo del TGF- β disminuye la producción de MEC inducida por la AngII ^{21, 202, 234}. La AngII y el TGF- β comparten algunos mecanismos intracelulares implicados en la fibrosis, como son la activación de proteínas quinasas y la producción de factores de crecimiento ^{21, 202, 203, 234, 241}. El bloqueo del receptor AT1 disminuye la activación de la ruta de las Smad en un modelo en ratas sometidas a infarto de miocardio y en modelos experimentales de daño renal ^{78, 247}. Sin embargo no existen estudios que investiguen el papel de la AngII en la activación de la vía de las Smad en CMLV ni su posible papel en la fibrosis vascular.

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) es un potente factor profibrótico. En CMLV, el TGF- β y la AngII aumentan la expresión génica y la producción del CTGF y proteínas de la MEC, como FN y colágenos ^{202, 241} y se ha sido descrito que el CTGF es un mediador de la fibrosis inducida por el TGF- β y la AngII ^{44, 181, 203}. Estudios recientes han demostrado que las Smad están implicadas en la regulación génica mediada por TGF- β ^{90, 95}. En esta tesis hemos investigado si la ruta de señalización de Smad participa en la regulación de la fibrosis vascular inducida por la AngII, evaluando su efecto sobre la modulación del CTGF y las proteínas de la MEC.

Vascular Medicine

Angiotensin II Activates the Smad Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells by a Transforming Growth Factor- β -Independent Mechanism

Juan Rodríguez-Vita, BSc; Elsa Sánchez-López, BSc; Vanesa Esteban, BSc; Mónica Rupérez, BSc; Jesús Egido, MD; Marta Ruiz-Ortega, PhD

Background—Angiotensin II (Ang II) participates in vascular fibrosis. Transforming growth factor- β (TGF- β) is considered the most important fibrotic factor, and Smad proteins are essential components of the TGF- β signaling system. Our aim was to investigate whether Ang II activates the Smad pathway in vascular cells and its potential role in fibrosis, evaluating connective tissue growth factor (CTGF) and extracellular matrix (ECM) proteins.

Methods and Results—Systemic infusion of Ang II into Wistar rats increased aortic Smad2, phosphorylated-Smad2, and Smad4 expression, associated with CTGF upregulation. In growth-arrested vascular smooth muscle cells, Ang II treatment for 20 minutes caused Smad2 phosphorylation, nuclear translocation of phosphorylated-Smad2 and Smad4, and increased Smad DNA-binding activity. Ang II also caused Smad overexpression and Smad-dependent gene transcription. The AT₁ antagonist losartan diminished Ang II-induced Smad activation. The blockade of endogenous TGF- β did not modify the activation of Smad caused by Ang II. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor SB203580 diminished Ang II-induced Smad2 phosphorylation. These data show that Ang II activates the Smad pathway via AT₁ receptors and MAPK activation independently of TGF- β . Transient transfection with Smad7, which interferes with receptor-mediated activation of Smad2, diminished Ang II-induced CTGF promoter activation, gene and protein expression, and fibronectin and type-1 procollagen overexpression, showing that Smad activation is involved in Ang II-induced fibrosis.

Conclusions—Our results show that Ang II activates the Smad signaling system in vascular cells in vivo and in vitro. Smad proteins are involved in Ang II-induced CTGF and ECM overexpression independently of TGF- β . This novel finding suggests that Smad activation could be involved in the profibrogenic effects of Ang II in vascular diseases. (*Circulation*. 2005;111:2509-2517.)

Key Words: angiotensin ■ cells ■ signal transduction ■ fibrosis

Vascular fibrosis is one of the main features of cardiovascular diseases, including hypertension.¹ The Smad proteins are essential components of the intracellular signaling pathways utilized by transforming growth factor- β (TGF- β) and participate in TGF- β -induced fibrosis.² TGF- β presents pleiotropic effects and can both positively and negatively regulate systems involved in cell proliferation, apoptosis, migration, and synthesis of extracellular matrix (ECM) proteins, such as fibronectin, collagen, and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in vascular smooth muscle cells (VSMCs). It therefore plays a major role in the development of cardiovascular diseases.³ On activation, TGF- β transduces its signal across the plasma membrane by binding to 2 specific serine/threonine kinase receptors, the type I and II receptors.^{2,4} TGF- β binds to type II receptor, which activates the type I receptor kinase, which, in turn, phosphorylates the receptor-regulated Smads (R-Smads) Smad2 and

Smad3 at C-terminal serines. The R-Smads then dissociate from the receptor complex to form a heterotrimeric complex with Smad4. These complexes translocate to the nucleus and function as transcriptional regulators of target genes. The inhibitory Smad7 binds to activated type I receptor, thereby preventing phosphorylation of Smad2/3, or recruits the ubiquitin ligases Smurf1 and Smurf2 to induce proteasomal degradation of the receptor complexes.^{2,4}

Angiotensin II (Ang II) regulates cell growth, inflammation, and fibrosis, contributing to the progression of vascular damage.^{1,5} The interrelation between Ang II and TGF- β is established. In different pathological settings and cell types, Ang II regulates TGF- β expression and may mediate some Ang II responses.^{1,5,6} ACE inhibitors and AT₁ antagonists diminish tissue expression of TGF- β and fibrosis, and blockade of TGF- β diminishes Ang II-induced ECM production.^{1,5,6} Ang II and TGF- β share some intracellular mecha-

Received June 12, 2004; revision received December 15, 2004; accepted January 11, 2005.

From the Vascular and Renal Research Laboratory, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma Madrid, Madrid, Spain.

Correspondence to: Marta Ruiz-Ortega, PhD, Vascular and Renal Research Laboratory, Fundación Jiménez Díaz, Avda Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. E-mail mruizo@fjd.es

© 2005 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/01.CIR.0000165133.84978.E2

nisms involved in fibrosis, including activation of protein kinases and production of growth factors.^{1,3,5-7} AT₁ blockade diminishes Smad pathway activation in myocardial infarction in rats and in an experimental model of renal damage.^{8,9} However, no studies have investigated whether Ang II activates the Smad signaling pathway in VSMCs and its potential role in vascular fibrosis.

Connective tissue growth factor (CTGF) is a potent profibrotic factor implicated in fibrotic processes, including hypertension, atherosclerosis, and myocardial infarction.¹⁰ CTGF has been described as a mediator of TGF- β - and Ang II-induced fibrosis.^{7,10,11} In VSMCs, TGF- β and Ang II increased gene expression and production of CTGF and ECM, such as fibronectin and collagens.^{3,5} Recent studies have demonstrated that Smads are involved in the regulation of those genes by TGF- β .^{12,13} We therefore investigated whether the Smad signaling pathway mediates Ang II-induced fibrosis, evaluating CTGF and ECM regulation.

Methods

Systemic infusion of Ang II (50 ng/kg per minute; subcutaneous osmotic minipumps; n=8 rats in each group) for 3 days was performed in female Wistar rats.⁷ One group was treated with the AT₁ antagonist losartan (10 mg/kg per day; n=8) starting 24 hours before Ang II infusion. Animals were anesthetized with 5 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer AG) and 35 mg/kg ketamine (Ketolar, Fisher) following European guidelines. VSMCs from Wistar rat thoracic aorta were obtained¹⁴ and serum-starved for 48 hours before use.

Protein Studies

For *in vivo* studies, paraffin-embedded sections of rat aorta were studied by immunohistochemistry.⁷ Antibodies used were as follows: Smad2, Smad4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif); phosphorylated-Smad2 (kindly donated by Dr Moustakas, Uppsala, Sweden for immunohistochemistry and immunofluorescence, and ABCAM, UK for Western blot); anti-CTGF (Torrey Pines Biolabs, San Diego, Calif); anti-fibronectin (Chemicon International, Temecula, Calif); anti-FLAG (Sigma, Spain); and peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham). Negative controls without the primary antibody or with an unrelated antibody were included to check for nonspecific staining. For *in vitro* studies, cells were fixed in Merckofix (Merck), treated with 0.1% Triton-X100, and incubated with primary antibodies followed by FITC-conjugated antibody.¹⁴ Nuclei were stained with 1 μ g/mL propidium iodide. Samples were mounted in Mowiol 40-88 (Sigma) and examined by a laser scanning confocal microscope (Leika). In VSMCs, protein levels were also determined by Western blot.⁷

Analysis of Smad DNA-Binding Activity

Smad DNA-binding activity was determined in 6- μ g nuclear extracts, obtained as described,¹⁴ by binding with a [γ -³²P]-ATP-labeled oligonucleotide that contains consensus CAGA-box, the Smad binding sequence (5'-TCGAGAGCCAGACAAAAGCCAGACATTTAGCCAGACAC-3') (Sta. Cruz),¹⁵ and complexes were analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). For competition studies, mutant CAGA-box oligo (5'-TCGAGAGCTAGATAAAAAGCTAGATATTAGCTAGATAC-3') was used. For supershift, nuclear extracts were incubated with Smads antibodies 1 hour before incubation with labeled oligonucleotide.

Transfection, DNA Constructs, and Promoter Studies

VSMCs, in 6-well plates, were transiently transfected with FuGENE (Roche Molecular Biochemicals) and the reporter expression vectors. Smad-dependent promoter activation was evaluated by trans-

fection of 1 μ g Smad/luc (kindly donated by Dr Volgestein, Baltimore, Md¹⁵) and 0.5 μ g TK-renilla as internal control (Clontech), and CTGF promoter activity was evaluated by 1 μ g CTGF/secreta alkaline phosphatase (SEAP) (kindly donated by Dr Oliver, Fibrogen¹³) and 0.25 μ g CMV- β -galactosidase (Clontech). After a 24-hour serum-starvation step, cells were stimulated for 24 hours, and conditioned media were assayed for luciferase/renilla or SEAP/ β -galactosidase activity, respectively. To block Smad pathway activation, cells were transfected with PcDNA3-FLAG-Smad7 expression vector (kindly donated by Dr Massagué, Rockefeller University, New York, NY).

Gene Studies

RNA was isolated by Trizol Invitrogen. Real-time polymerase chain reactions (PCRs) were performed on an ABI Prism 7500 sequence detection PCR system (Applied Biosystems) according to manufacturer's protocol. CTGF and type 1 procollagen assay IDs are as follows: Rn00573960_m1 and Rn00584426_m1, respectively. These expression levels were normalized with GAPDH and 18s ribosomal RNA expression, whose assay IDs are Rn99999916_m1 and Hs99999901_s1, respectively.

Statistical Analysis

The autoradiographs were scanned with the use of the GS-800 calibrated densitometer (Quantity One, Bio-Rad). Results are expressed as n-fold increase over control as mean \pm SEM of experiments made. Significance was established with GraphPAD Instat with the use of Student *t* test (GraphPAD Software), Wilcoxon test, and Student-Newman-Keuls test. Differences were considered significant when *P* < 0.05.

Results

Systemic Infusion of Ang II Increases Smad Expression in Aorta

In the aorta of control animals, a slight immunostaining for total Smad2 and Smad4 was observed, which was markedly increased in Ang II-infused rats (Figure 1A). In these animals enhanced accumulation of phosphorylated-Smad2 proteins in the nuclei of cells (mainly VSMCs) was found (Figure 1B). Ang II-infused rats also presented elevated CTGF expression (Figure 1A). The AT₁ antagonist losartan diminished aortic Smad2, Smad4, and CTGF overexpression, suggesting that Ang II through AT₁ receptor regulates Smad proteins *in vivo*.

Ang II Activates Smad Pathway in VSMCs

Ang II Caused Smad2 Phosphorylation

One of the initial steps of the activation of Smad pathway is the phosphorylation of R-Smads.^{2,4} After treatment of growth-arrested VSMCs with Ang II for 20 minutes, we observed that phosphorylated-Smad2 protein levels were increased (Western blot; Figure 2A), showing that Ang II induced Smad2 phosphorylation.

Ang II Caused Nuclear Translocation of Smad4 and Phosphorylated-Smad2

In growth-arrested VSMCs, the Smad proteins Smad4 and Smad2 are located in the cytosol. Treatment with Ang II for 20 minutes caused nuclear translocation of Smad4 (confocal microscopy; Figure 2B). This effect was similar to that found with TGF- β treatment. Stimulation with Ang II increased total phosphorylated-Smad2 staining and caused a marked translocation of phosphorylated-Smad2 from the cytosol to the nuclei (Figure 2C).

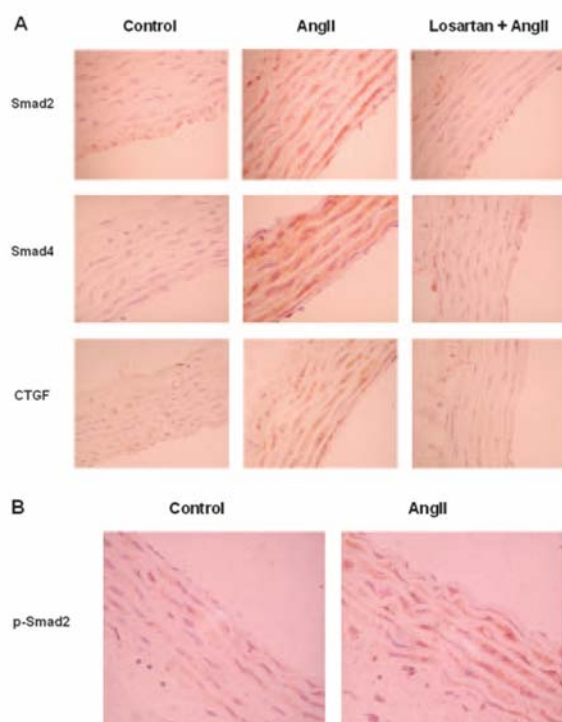


Figure 1. Ang II infusion increases Smad expression in rat aorta. Rats were infused with Ang II (50 ng/kg per minute) for 3 days. One group was treated with losartan (AT_1 antagonist; 10 mg/kg per day). Aortic samples were analyzed by immunohistochemistry with the use of antibodies against Smad2, Smad4, and CTGF (A) and phosphorylated-Smad2 (p-Smad2) (B). A representative animal of 8 studied in each group is shown. Magnification $\times 400$.

Ang II Increased Smads Production

Stimulation of VSMCs with Ang II for 48 hours caused a significant elevation of total Smad2 and Smad4 protein levels (Western blot; Figure 2D).

Ang II Increased Smad DNA-Binding Activity and Activated Smad-Dependent Gene Transcription

In the nucleus, R-Smad/Smad4 complex can activate transcription through direct binding to certain DNA sequences.¹⁵ In VSMCs, Ang II increased CAGA-box DNA-binding activity as early as 5 minutes and peaked between 15 and 20 minutes. This response was similar to that observed with TGF- β (Figure 3A). By supershift assays, the composition of Ang II-induced Smad complexes was studied (Figure 3B). Antibodies to Smad4 alone or combined Smad2/Smad4 shifted the band to a higher molecular weight. However, no effect was seen with Smad2 alone. Similar results were obtained in TGF- β -treated VSMCs. These data show that the Smad complex activated by Ang II is Smad2/Smad4 and that the protein that binds to the DNA is Smad4.

We investigated whether Ang II regulates Smad-mediated gene expression, by transient transfection with a luciferase Smad reporter plasmid (Smad/luc) that contains 4 copies of the recognition site for the Smad sequence.¹⁶ Ang II potently

increased Smad promoter activity (Figure 4), as observed with TGF- β .

Ang II Activates Smad Pathway via AT_1

In VSMCs, Ang II acts through 2 specific receptors, AT_1 and AT_2 .⁵ The AT_1 antagonist losartan significantly diminished Ang II-induced Smad activation (phosphorylation of Smad2, nuclear translocation of Smad2/Smad4, Smad overexpression, and Smad DNA-binding activation), whereas the AT_2 antagonist PD123319 had no effect (Figures 2A, 2C, 2D, 3C), suggesting that Ang II-induced Smad activation is mediated through AT_1 .

Molecular Mechanisms of Ang II-Induced Smad Activation

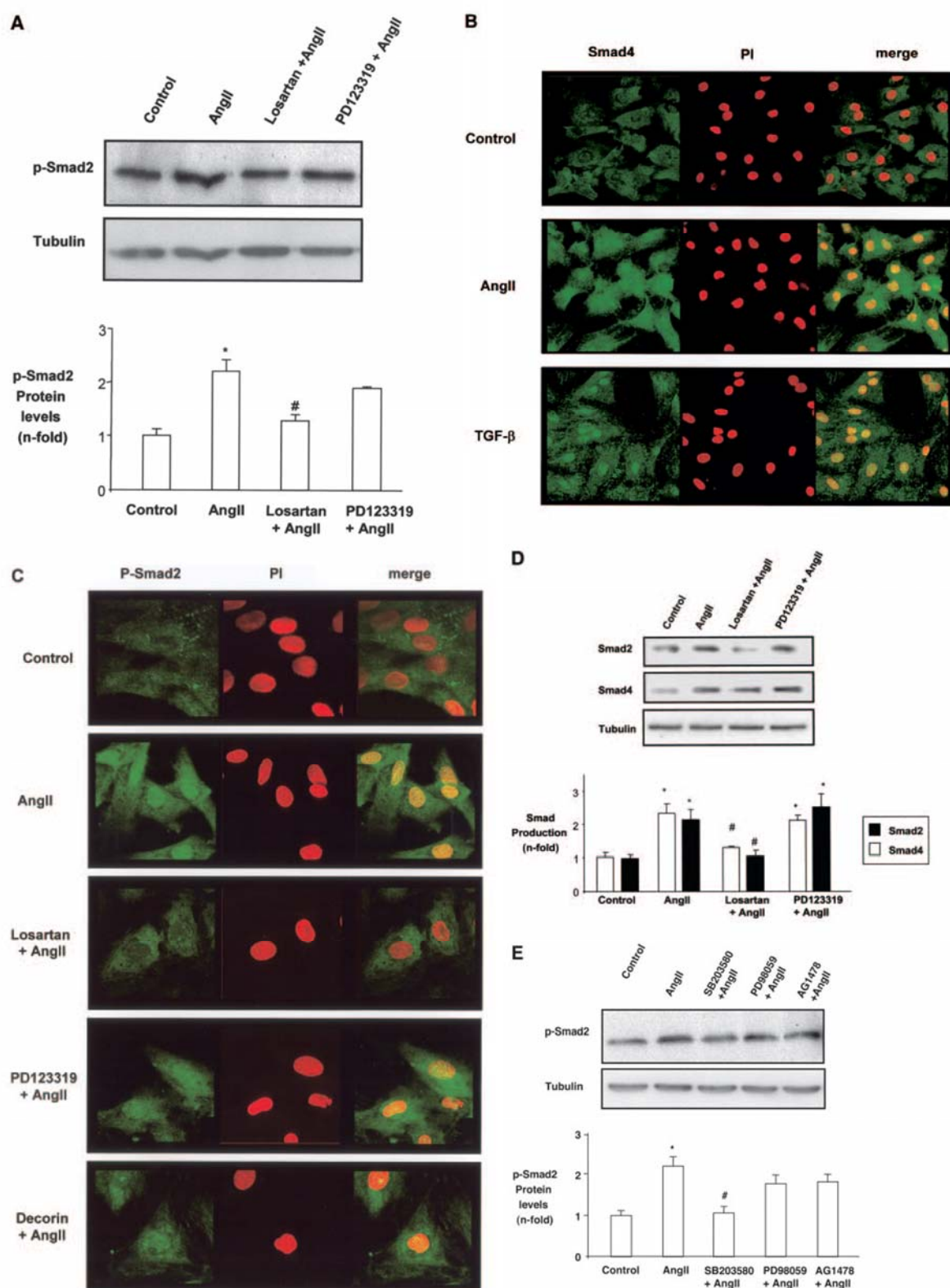
Ang II via AT_1 receptors activates intracellular signaling systems, including mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation, that participate in the regulation of fibrosis.^{17–20} Treatment of VSMCs with the p38 MAPK inhibitor SB203580 markedly diminished Ang II-induced Smad2 phosphorylation (Figure 2E), whereas the ERK inhibitor PD98059 had no effect. The inhibitor of EGF receptor transactivation AG1478 did not modify phosphorylated-Smad2 levels, showing that this mechanism is not involved in Ang II/Smad signaling. These data suggest that Smad2 phosphorylation, and therefore Smad pathway activation, is dependent on p38 MAPK activation.

Ang II Activates Smad Pathway by a TGF- β -Independent Mechanism

To clearly demonstrate that Ang II activates the Smad pathway independently of TGF- β , we used VSMCs from Wistar rats. These cells have been previously described to be unable to activate TGF- β in vitro.²¹ In control experiments, TGF- β levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay in conditioned media from Ang II-treated VSMCs. No active TGF- β levels were detected, but Ang II increased latent TGF- β production (data not shown). Blockade of endogenous TGF- β , by the extracellular matrix proteoglycan decorin or by neutralizing TGF- β antibody, did not modify Ang II-induced nuclear translocation of phosphorylated-Smad2, Smad DNA-binding activity, and promoter activation (Figures 2C, 3D, 4). These data show that Ang II activates the Smad pathway independently of endogenous TGF- β production or activation.

Ang II-Induced CTGF and Fibronectin Upregulation Is Mediated by Smad Activation

We evaluated whether Smad activation caused by Ang II is involved in CTGF regulation. In VSMCs, Ang II and TGF- β potently induced CTGF promoter activation (not shown) and CTGF protein synthesis.⁷ To block Smad actions, cells were transiently transfected with an expression vector encoding Smad7, which interferes with receptor-mediated activation of Smad2 and Smad3, known to inhibit TGF- β /Smad-mediated transcriptional effects.²² Overexpression of Smad7 (determined by anti-FLAG antibody) inhibited the inducible expression of CTGF promoter (Figure 5) and CTGF gene

2512 *Circulation* May 17, 2005


expression and protein production (Figure 6) caused by Ang II and TGF- β compared with treated cells transfected with empty vector. CTGF has been described as a mediator of TGF- β - and Ang II-induced fibrosis. In VSMCs we demonstrated that CTGF mediates Ang II-induced fibronectin production. Overexpression of Smad7 markedly diminished Ang II- and TGF- β -induced fibronectin production, whereas no effect was seen in cells transfected with empty vector (Figure 7A). Overexpression of Smad7 also diminished type-I procollagen expression, measured by real-time PCR (Figure 7B). These data clearly demonstrate that Smad7 overexpression diminished Ang II-induced CTGF promoter activation and protein production of CTGF and ECM proteins, showing that the Smad pathway is involved in Ang II-induced fibrosis.

Discussion

Our results show that Ang II activates the Smad signaling system in vascular cells both *in vivo* and *in vitro*. We also found that Smad proteins participate in Ang II-induced CTGF overexpression and ECM production. This novel finding suggests that Smad pathway activation may be involved in the profibrogenic effects of Ang II in vascular diseases.

To evaluate the effect of Ang II on the Smad signaling pathway *in vivo*, we used the model of systemic infusion of Ang II. In this model, Ang II causes vascular fibrosis that can be mediated by CTGF overexpression.⁷ In the aorta of control animals, we observed a weak staining of Smad proteins, which were markedly upregulated in Ang II-infused rats. Importantly, positive staining for phosphorylated-Smad2 was found to be mainly located in the nuclei of VSMCs. The increased expression of Smad proteins was associated with CTGF induction, preceding the accumulation of ECM proteins observed after 7 days,⁷ suggesting that the Smad signaling pathway could be a mechanism involved in vascular fibrosis caused by Ang II.

To clearly demonstrate that Ang II activates the Smad signaling pathway through direct activation of VSMCs and independent of hypertension- or hemodynamic-induced changes, we performed experiments in cultured VSMCs. In these cells, Ang II caused Smad2 phosphorylation, nuclear translocation of phosphorylated-Smad2 and Smad4, increased DNA-binding activity to CAGA-box oligonucleotide, and overexpression of Smad2 and Smad4. Ang II-induced Smad activation is very rapid (as early as 5 minutes and peaking over 15 to 20 minutes). Moreover, we demonstrated that Ang

II increased Smad-dependent gene transcription by transient transfection with a reporter plasmid containing Smad promoter binding sites.

Smad proteins have been identified as TGF- β downstream intracellular signals. Smad are TGF- β receptor kinase substrates that translocate into the cell nucleus to act as transcription factors.^{2,4} There are several Smad proteins. Smad2 and Smad3 are specific mediators of TGF- β /activin pathways, whereas Smad1, Smad5, and Smad8 are involved in bone morphogenetic protein (BMP) signaling.^{2,4} Smad4 forms hetero-oligomers with the pathway-restricted Smads and is a common mediator of TGF- β and BMP signaling. At physiological concentrations, Smad6 may selectively inhibit BMP receptor signaling, whereas Smad7 inhibits both BMP and TGF- β /activin receptor signaling. In VSMCs, we found that Ang II activates Smad2 and Smad4, showing similarities to TGF- β . We compared the response of Ang II and TGF- β , observing that both factors activate the Smad pathway with a similar kinetic response, suggesting a direct Ang II-induced Smad activation. It is well known that Ang II upregulates TGF- β mRNA expression, protein synthesis, and conversion of TGF- β to its active form.⁶ To demonstrate that the effect of Ang II was independent of endogenous TGF- β production or activation, we used VSMCs from Wistar rats, in which we confirmed that Ang II was unable to activate TGF- β , as reported,²¹ although it increased total TGF- β production. In addition, we blocked TGF- β by different methods: a neutralizing antibody against active TGF- β and decorin, a scavenger of its active form. The blockade of endogenous TGF- β did not alter nuclear translocation of phosphorylated-Smad2, Smad DNA-binding activity, and Smad-dependent promoter activation caused by Ang II. These data clearly indicate that TGF- β blockade did not modify Ang II-induced Smad pathway activation, showing a TGF- β -independent Smad signaling elicited by Ang II.

Ang II acts through its binding to specific receptors.⁵ AT₁ is responsible for most of the pathophysiological actions of Ang II. It contributes to chronic diseases, such as hypertension, atherosclerosis, cardiac hypertrophy, and renal injury, by promoting cell growth, inflammation, and fibrosis. AT₂ is involved in cell growth inhibition and renal inflammatory cell recruitment.⁵ The AT₁ antagonist losartan diminished Smad overexpression in Ang II-infused rats and in cultured VSMCs and blocked Ang II-induced Smad signaling activation (Smad2 phosphorylation, nuclear translocation, and DNA binding). Our data clearly demonstrate that Ang II activates the Smad pathway via AT₁ receptors. Ang II via AT₁

Figure 2. A, Ang II induces phosphorylation of Smad2 in rat VSMCs. Cells were treated with 10^{-7} mol/L Ang II for 20 minutes. Some cells were pretreated for 30 minutes with 10^{-6} mol/L losartan (AT₁ antagonist) or 10^{-5} mol/L PD123319 (AT₂ antagonist) before Ang II treatment. A representative Western blot of phosphorylated-Smad2 (p-Smad2) in top panel and mean \pm SEM data of 4 experiments in bottom panel are shown. Results of phosphorylated-Smad levels were obtained from densitometric analysis and expressed as ratio phosphorylated-Smad/tubulin and as n-fold over control. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs Ang II. Ang II causes nuclear translocation of Smad4 (B) and phosphorylated-Smad2 (p-Smad2) (C) proteins in VSMCs. Immunofluorescent staining of cells treated with Ang II or 10 ng/mL TGF- β for 20 minutes is shown. Some cells were pretreated with losartan, PD123319, or 10^{-5} mol/L decorin. VSMCs were also stained with propidium iodide (PI) (nuclear staining). The results are representative of 4 independent observations. D, Ang II increases Smad2 and Smad4 protein expression. VSMCs were treated with 10^{-7} mol/L Ang II for 48 hours, and protein levels were measured by Western blot. E, Ang II activates Smad pathway via MAPK. Cells were pretreated with 10^{-6} mol/L SB203580 (p38 inhibitor), 2×10^{-5} PD98059 (Erk p42/44 inhibitor), and 250 nmol/L AG1478 (EGF receptor kinase inhibitor) before Ang II treatment for 20 minutes. A representative Western blot of phosphorylated-Smad in top panel and mean \pm SEM data of 4 experiments in bottom panel are shown. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs Ang II.

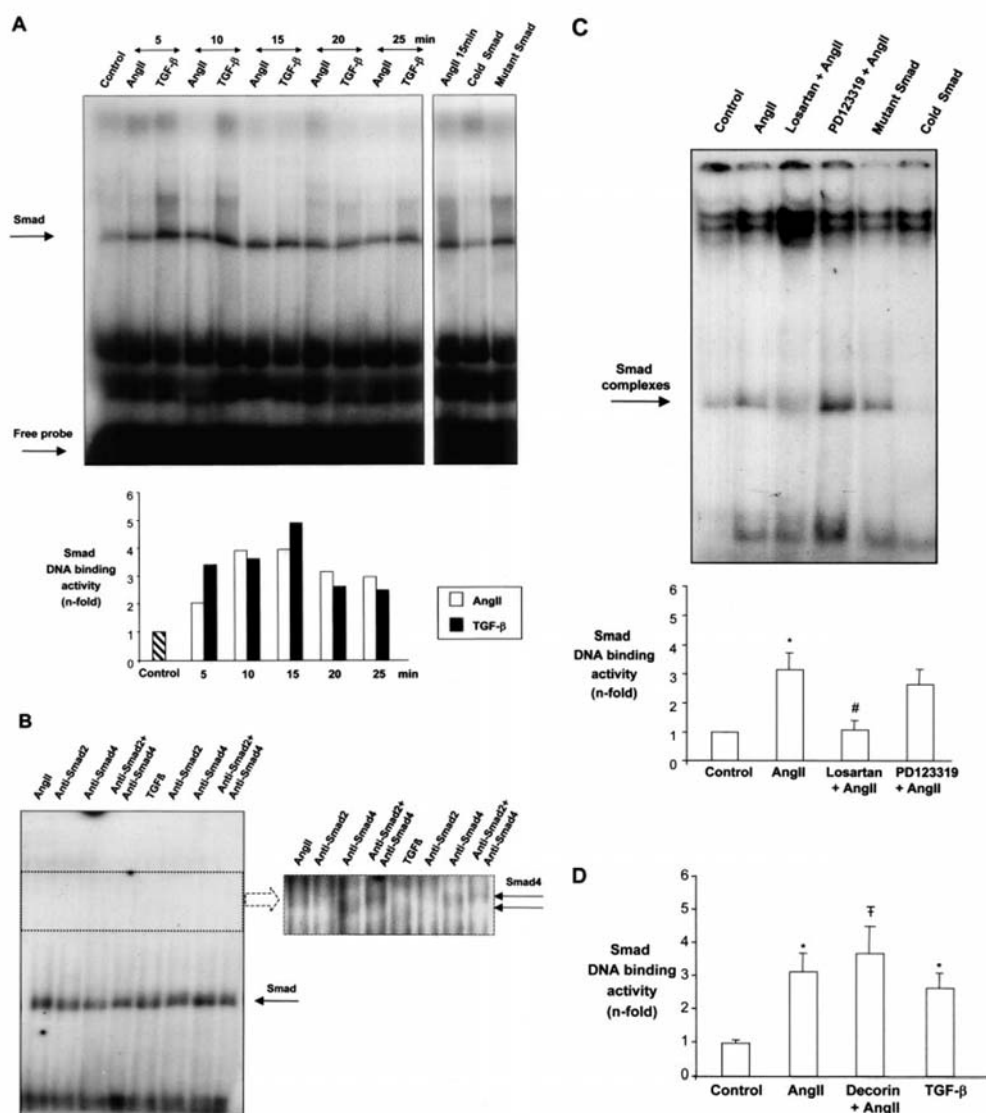


Figure 3. Ang II increases CAGA-box DNA-binding activity in rat VSMCs. **A**, Time course. VSMCs were incubated with 10^{-7} mol/L Ang II or 10 ng/mL TGF- β from 5 to 25 minutes. Smad activity was determined by EMSA. Competition assays with 100-fold excess of unlabeled or mutant CAGA-box show specific Smad complexes. Identification of Smad complexes induced by Ang II in rat VSMCs is shown. **B**, The nuclear extracts of Ang II- and TGF- β -treated VSMCs were preincubated for 1 hour with antibodies against Smad2 and Smad4, alone or in combination, and protein complexes were resolved by electrophoresis (supershift). Supershifted bands are observed with anti-Smad4 and with the combination of both antibodies (marked by arrows). A representative EMSA of 3 experiments is shown. Ang II, via AT $_1$ receptors (**C**) but independent of TGF- β (**D**), increases CAGA-box DNA-binding activity. In top panels, a representative EMSA from 3 to 5 different experiments with similar results is shown; in bottom panels, mean \pm SEM values are obtained by densitometric analysis. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs Ang II; † $P = NS$ vs Ang II.

regulates the expression of profibrotic growth factors (including CTGF) and ECM.^{5,7} Our data show that activation of Smad signaling by AT $_1$ receptors could be a novel mechanism involved in Ang II-induced vascular fibrosis. Other data support this information. After myocardial infarction in rats, AT $_1$ blockade attenuated the activation of TGF- β and normalized total Smad2 and Smad4 in the infarct scar. In cultured primary rat fibroblasts, Ang II via AT $_1$ caused rapid phosphorylated-Smad2 nuclear translocation,⁸ suggesting that

Ang II-induced Smad signaling is associated with fibrotic events in the heart. In a model of renal injury caused by ureteric obstruction, activation of Smad2 was found to be associated with interstitial fibrosis and tubule atrophy. AT $_1$ blockade downregulated Smad2 protein and activity and attenuated the chronic tubulointerstitial injury in obstructed kidneys.⁹ These data indicate that Smad signaling could be a common mechanism of Ang II-mediated fibrosis in cardiovascular and renal diseases.

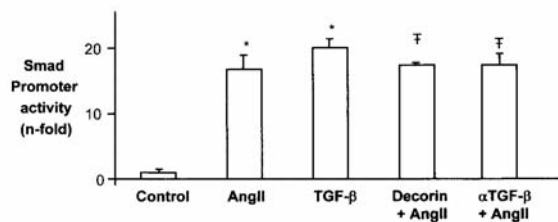


Figure 4. Ang II activates Smad-dependent transcription in rat VSMCs. Cells were transfected with Smad/luc promoter and TK-renailla. After 24-hour serum starvation, VSMCs were incubated with 10^{-7} mol/L Ang II or 10 ng/mL TGF- β for 24 hours. Some cells were treated with 10^{-5} mol/L decorin or 10 μ g/mL TGF- β neutralizing antibody, and then luciferase/renailla activity was measured. Data are mean \pm SEM of 4 experiments. * P <0.05 vs control; † P =NS vs Ang II.

The activation of the Smad signaling pathway causes nuclear translocation of Smads. In the nucleus, Smads interact with transcription factors at the promoters of some genes and regulate transcription. This process is subject to regulation by other signaling pathways, such as MAPK.^{2,4} It is well known that many responses elicited by Ang II are mediated by MAPK.^{17–20} We found that p38 activation is necessary for Smad activation, showing the involvement of MAPK in this process. In VSMCs, we found that Ang II activates a Smad-dependent promoter, suggesting Smad-mediated gene transcription. Previous studies have shown that TGF- β , via Smad activation, upregulates the transcription of several genes important for cell cycle regulation, which mediate the antiproliferative response and partially explain the tumor suppressive action of TGF- β ,²³ as well as genes for ECM formation, such as procollagen, fibronectin, and PAI-1.^{12,15,24} Overexpression of some Smad proteins activates transcription of some of these genes, such as PAI-1, even in the absence of TGF- β .^{2,3} In CTGF promoter there is a functional Smad binding site.¹³ In mesangial cells, TGF- β activates CTGF via Smad,¹³ as we observed here in VSMCs. CTGF is an important profibrotic factor¹⁰ and is an upstream mediator of Ang II-induced vascular fibrosis.⁷ In VSMCs, Ang II increased CTGF mRNA expression, promoter activity, and protein production. Smad7 may function as a general negative regulator of TGF- β receptor signaling.²² Transient transfection

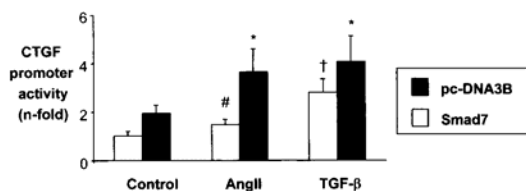


Figure 5. Ang II via Smad pathway increases CTGF promoter activation. Cells were transiently transfected with a CTGF/SEAP promoter, CMV- β -galactosidase, and cotransfected with FLAG-Smad7 expression vector or empty vector (pcDNA3B). After 24 hours, cells were treated with 10^{-7} mol/L Ang II and 10 ng/mL TGF- β for 24 hours. White bars represent cells transfected with Smad7, and black bars represent cells transfected with empty vector. Values are mean \pm SEM of 3 replicates of 3 independent experiments. * P <0.05 vs control; # P <0.05 vs Ang II; † P <0.05 vs TGF- β .

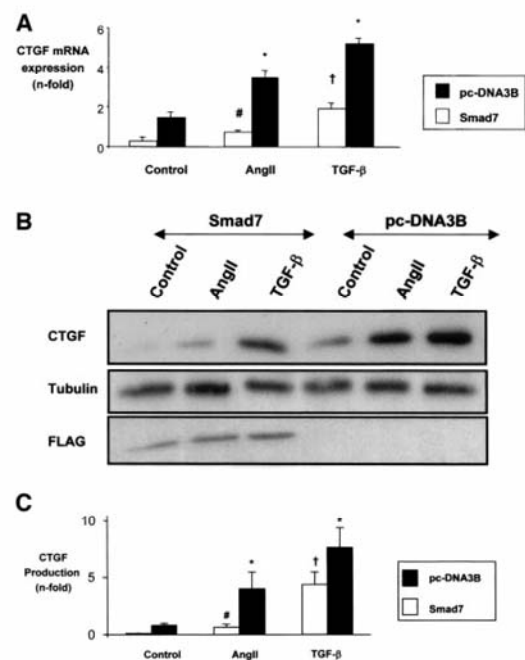


Figure 6. Ang II via Smad pathway increases CTGF protein synthesis in VSMCs. Cells were transiently transfected with FLAG-Smad7 expression vector or empty vector (pcDNA3B) and then stimulated with 10^{-7} mol/L Ang II or 10 ng/mL TGF- β for 24 hours. A, mRNA expression as mean \pm SD of 2 experiments obtained by real-time PCR. B, Representative Western blot. C, Values of total CTGF production as mean \pm SEM of 4 experiments. Results of total CTGF production were obtained from densitometric analysis and expressed as ratio CTGF/tubulin and as n-fold over control. * P <0.05 vs control; # P <0.05 vs Ang II; † P <0.05 vs TGF- β .

tion with Smad7, which interferes with receptor-mediated activation of Smad2 and Smad3, diminished Ang II-induced CTGF promoter activation, mRNA expression, and protein production. Several works have demonstrated that overexpression of Smad7 blocks TGF- β -induced ECM production and heme oxygenase-1 expression in renal cells^{25–28} and in bleomycin-induced lung fibrosis.²⁹ In VSMCs we observed that Smad7 overexpression decreased fibronectin and type 1 procollagen upregulation caused by Ang II. Our results show that the Smad pathway is involved in Ang II-induced CTGF and ECM overexpression and could contribute to the profibrotic effects of Ang II in vascular diseases.

Other factors involved in tissue damage have been shown to activate Smad signaling. In cells transfected to express TGF- β receptor type II, insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) stimulated Smad2 and Smad3 phosphorylation, potentiated TGF- β 1-stimulated Smad phosphorylation, and cooperated with exogenous TGF- β 1 in cell growth inhibition.³⁰ In PC12 cells, nerve growth factor led to activation of the Smad pathway independent of TGF- β .³¹ Advanced glycation end products caused rapid Smad2/3 activation in renal and vascular cells that was independent of TGF- β ,³² suggesting the importance of Smad pathway in diabetic organ injury. Our study has demonstrated that Ang II activates

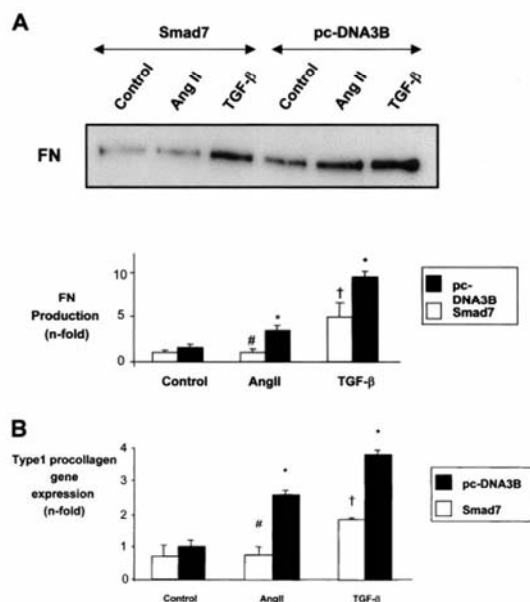


Figure 7. Smad pathway is involved in Ang II-induced fibronectin (FN) production (A) and type-1 procollagen gene expression (B). VSMCs were transiently transfected with FLAG-Smad7 expression vector or empty vector (pcDNA3B) and serum starved for 24 hours. Then cells were stimulated with 10^{-7} mol/L Ang II or 10 ng/mL TGF- β for 48 hours in fibronectin production (A) and for 18 hours for type 1 procollagen mRNA expression (B). A, Representative Western blot in top panel; bottom panel shows mean \pm SEM values of total fibronectin production of 4 experiments. B, Type 1 procollagen mRNA expression as mean \pm SD of 2 experiments. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs Ang II; † $P < 0.05$ vs TGF- β .

Smad signaling in vascular cells, independently of TGF- β . These data provide further evidence that the Smad proteins are not exclusively activated by the classic TGF- β -triggered mechanism.

In conclusion, our data show that Ang II activates the Smad signaling system in VSMCs, independently of TGF- β . In Ang II-infused rats, aortic Smad overexpression was associated with CTGF induction and preceded ECM overexpression, suggesting that Smad proteins could be involved in Ang II-induced structural changes of the vascular wall. These data may contribute to our knowledge of the mechanisms underlying fibrosis in cardiovascular diseases.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (PI020513, PI020822), Comunidad Autónoma de Madrid (084/0018/2001), Red Cardiovascular (RECAVA, MP04), and Sociedad Española de Cardiología and European Project (QLG1-CT-2002-01215). J.R.-V., E.S.-L., M.R., and V.E. are fellows of FIS. We thank Mar Gonzalez Garcia-Parreño for her technical help with confocal microscopy and Alexander G. Borun for his careful reading of the manuscript.

References

1. Tunon J, Ruiz-Ortega M, Egido J. Regulation of matrix proteins and impact on vascular structure. *Curr Hypertens Rep.* 2000;2:106–113.
2. Massague J, Chen YG. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev.* 2000;4: 627–644.

3. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor- β signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol.* 2002;118:211–215.
4. Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor- β s: Smad signaling and physiopathological roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1161–1165.
5. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5: 73–79.
6. Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor- β and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension.* 1998;31:181–188.
7. Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation.* 2003;108:1499–1505.
8. Hao J, Wang B, Jones SC, Jassal DS, Dixon IM. Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro. *Am J Physiol.* 2000;279:H3020–H3030.
9. Wamsley-Davis A, Padda R, Truong LD, Tsao CC, Zhang P, Sheikh-Hamad D. AT1A-mediated activation of kidney JNK1 and SMAD2 in obstructive uropathy: preservation of kidney tissue mass using candesartan. *Am J Physiol.* 2004;287:F474–F480.
10. Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet.* 2004;363:62–64.
11. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor β -induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J.* 1999;13:1774–1786.
12. Isono M, Chen S, Hong SW, Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN. Smad pathway is activated in the diabetic mouse kidney and Smad3 mediates TGF- β -induced fibronectin in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296:1356–1365.
13. Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. CTGF and SMADs: maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem.* 2001;276:10594–10601.
14. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor κ B through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res.* 2000; 86:1266–1272.
15. Denmler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 1998;17:3091–3100.
16. Fink SP, Swinler SE, Lutterbaugh JD, Massague J, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JK, Markowitz S. Transforming growth factor- β -induced growth inhibition in Smad4 mutant colon adenoma cell line. *Cancer Res.* 2001;61:256–260.
17. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussault JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension.* 2000;36:330–336.
18. Natarajan R, Scott S, Bai W, Yemini KK, Nadler J. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. *Hypertension.* 1999;33(pt 2):378–384.
19. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griending KK. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II: role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 1998;273:15022–15029.
20. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998;273:8890–8896.
21. Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Role of AP-1 complex in angiotensin II-mediated transforming growth factor- β expression and growth of smooth muscle cells: using decoy approach against AP-1 binding site. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;243:361–367.
22. Nakao A, Okumura K, Ogawa H. Smad7: a new key player in TGF- β -associated disease. *Trends Mol Med.* 2002;8:361–363.
23. Moustakas A, Pardoll K, Gaal A, Heldin CH. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett.* 2002;82:85–91.
24. Chen SJ, Yuan W, Lo S, Trojanowska M, Varga J. Interaction of Smad3 with a proximal Smad-binding element of the human α 2(I) pro-

- collagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF- β . *J Cell Physiol.* 2000;183:381–392.
25. Li JH, Zhu HJ, Huang XR, Lai KN, Johnson RJ, Lan HY. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF- β on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:1464–1472.
26. Lan HY, Mu W, Tomita N, Huang XR, Li JH, Zhu HJ, Morishita R, Johnson RJ. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1535–1548.
27. Hill-Kapturczak N, Truong L, Thamilselvan V, Visner GA, Nick HS, Agarwal A. Smad7-dependent regulation of heme oxygenase-1 by transforming growth factor- β in human renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275:40904–40909.
28. Chen R, Huang C, Morinelli TA, Trojanowska M, Paul RV. Blockade of the effects of TGF- β 1 on mesangial cells by overexpression of Smad7. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:887–893.
29. Nakao A, Fujii M, Matsumura R, Kumano K, Saito Y, Miyazono K, Iwamoto I. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 1999;104:5–11.
30. Fanayan S, Firth SM, Butt AJ, Baxter RC. Growth inhibition by insulin-like growth factor-binding protein-3 in T47D breast cancer cells requires transforming growth factor- β (TGF- β) and the type II TGF- β receptor. *J Biol Chem.* 2000;275:39146–39151.
31. Lutz M, Kriegelstein K, Schmitt S, ten Dijke P, Sebald W, Wizenmann A, Knaus P. Nerve growth factor mediates activation of the Smad pathway in PC12 cells. *Eur J Biochem.* 2004;271:920–931.
32. Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Oldfield M, Cooper M, Truong LD, Johnson RJ, Lan HY. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF- β -dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *FASEB J.* 2004;18:176–178.

El TGF- β es mediador de las acciones de las estatinas sobre las células de músculo liso vascular.

En esta parte de la tesis desarrollamos el objetivo 4. Para ello se ha realizado el siguiente estudio.

El papel del TGF- β en la patogénesis de la aterosclerosis no se ha definido completamente. Se le ha supuesto un papel proaterogénico por su capacidad de promover fibrosis^{116, 201} y regeneración de la neoíntima, como se ha demostrado en modelos experimentales de daño por balón en ratas^{204, 225}. Datos recientes sugieren una función protectora en la aterosclerosis⁷⁰. Estudios realizados en modelos experimentales de aterosclerosis en ratones han mostrado que el bloqueo del TGF- β acelera la formación de la placa y su progresión hacia un fenotipo inestable^{134, 141, 188}. El TGF- β tiene propiedades antiinflamatorias protectoras debidas a sus efectos inmunomoduladores en células importantes en la aterosclerosis, incluyendo CE, CMLV, macrófagos y células T^{70, 188}. El TGF- β tiene efectos pleiotrópicos en las células cardiovasculares, regulando tanto positivamente como negativamente sistemas implicados en la proliferación celular, apoptosis, diferenciación y migración. En CMLV en cultivo el TGF- β tiene un efecto dual en el crecimiento celular^{201, 208} y aumenta la producción de colágeno y mediadores profibróticos, como CTGF²⁰¹. El TGF- β regula el equilibrio entre inflamación y acumulación de MEC, siendo un factor principal para el mantenimiento de la estabilidad de la placa aterosclerótica en humanos¹³⁴. Todos estos datos demuestran la complejidad de la función del TGF- β en la pared vascular.

Los inhibidores de la reductasa de 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima-A (HMG-CoA), también conocidos como estatinas, se han descrito ampliamente como fármacos muy útiles en aterosclerosis^{49, 170}. Inicialmente fueron empleados en la aterosclerosis por sus efectos en la reducción de los niveles de colesterol. Sin embargo, han surgido numerosos efectos beneficiosos independientes de la reducción del colesterol que se han denominado “efectos pleiotrópicos”⁴⁹. En concreto se sabe que inhiben las respuestas celulares activadas por Ang II como las rutas de RhoA/quinasa de Rho y las MAPKs. Sin embargo, en un estudio previo de nuestro grupo observamos que las estatinas no eran capaces de modificar la activación de las Smad dependiente de Ang II (en prensa en “hypertension”). Por lo que uno de los objetivos de esta tesis fue determinar si las estatinas regulaban la ruta de las Smad inducida por TGF- β ya que esta es la ruta principal empleada por este factor.

Se ha sugerido una interacción entre las estatinas y el TGF- β . La inhibición de la HMG-CoA reductasa aumentó los niveles circulantes de TGF- β y la síntesis de TGF- β en monocitos¹⁸³. En cardiomiocitos, las estatinas aumentaron la expresión del TRII¹⁷⁸, pero no hay ningún dato en células vasculares. En esta tesis hemos explorado los mecanismos implicados en esta relación y si los efectos beneficiosos podrían deberse a la modulación de la ruta TGF- β /Smad.

Description of a novel mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells: The regulation of Smad pathway

Juan Rodríguez-Vita, BSc, Eva Sánchez-Galán, Beatriz Santamaria, Alberto Ortiz, Luis Miguel Blanco-Colio, Elsa Sánchez-López, Raquel Rodrigues-Díez, Gisselle Carvajal-González, Jesús Egido, Marta Ruiz-Ortega.

Vascular and Renal Research Laboratory. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma Madrid. Spain

Abstract:

The 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors (or statins), exert proven beneficial effects on atherosclerosis. We have found that in vascular smooth muscle cells (VSMC) statins increased the activation of Smad pathway by transforming growth factor- β (TGF- β). In addition, in VSMC statins also induced TGF- β synthesis and TRII upregulation, leading to an increase in TGF- β -dependent actions. Statins make VSMCs more susceptible to TGF- β induced apoptosis, and increase TGF- β dependent ECM upregulation. Our data describe a close relationship between statins and TGF- β in different aspects of the atherosclerotic process, and suggests that the beneficial effects of statins could be mediated by modulation of the TGF- β /Smad pathway.

INTRODUCTION

The role of transforming growth factor- β (TGF- β) in the pathogenesis of atherosclerosis has not been completely defined. A pro-atherogenic role was suspected because of its ability to promote fibrosis ^{1, 2}, and neointima formation, as shown in experimental models of balloon-injury in rats ^{3, 4}. Recent data suggest a protective role for TGF- β in atherosclerosis ⁵. Studies in experimental models of atherosclerosis in mice have shown that TGF- β blockade accelerates plaque formation and its progression toward an unstable phenotype ⁶⁻⁸. TGF- β has protective anti-inflammatory properties due to its immunomodulating effects on cells important in atherosclerosis, including endothelial cells, vascular smooth muscle cells (VSMC), macrophages, and T cells ^{5, 8}. TGF- β exerts pleiotropic effects on cardiovascular cells, regulating in a positive or negative way systems involved in cell proliferation, apoptosis, differentiation and migration. In cultured VSMC, TGF- β has a dual effect on cell growth ^{1, 9}, and increases the production of collagen and profibrotic mediators, such as connective tissue growth factor (CTGF) ¹. TGF- β regulates the balance between inflammation and extracellular matrix (ECM) accumulation, being a key player for the maintenance of plaque stability in humans ⁷. These data show the complexity of the role of TGF- β in the vessel wall.

TGF- β acts through its binding to specific receptors ^{1, 10}. TGF- β receptor type I (TRI), also named activin like kinase (ALK), and TGF- β receptor type II (TRII), which are serine/threonine kinases. TRII recruits TGF- β enabling dimerization with TRI which transmits TGF- β signaling into the cell ^{1, 10}. VSMC had different TGF- β receptor expression profiles in atherosclerotic lesions compared with normal vessel wall ¹¹. In normal vessels, TRII is the most abundant. TGF- β through this receptor increases contractile protein expression. In diseased vessels, cells dominantly expressed TRI, and then TGF- β could promote early fatty-streak lesion formation ¹¹. TGF- β predominantly transmits the signals through cytoplasmic proteins called Smads which act as transcription factors ¹. In VSMC, TGF- β 1, via ALK5, increases phosphorylation of Smad2 and Smad3, which bind to Smad4. This complex translocates into the nucleus where it interacts with various transcription factors regulating the expression of TGF- β -responsive genes.

The 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors, also known as statins, have been largely reported as very useful drugs in atherosclerosis ^{12, 13}. They were initially used to treat atherosclerosis because of their effects on cholesterol lowering. Nevertheless, multiple pleiotropic

beneficial effects have been observed ¹³. However, there are no data about the effect of statins on Smad pathway regulation. An interaction between statins and TGF- β has been suggested. HMG-CoA reductase inhibition increases TGF- β circulating levels and TGF- β synthesis in monocytes ¹⁴. In cardiomyocytes, statins increase TRII expression ¹⁵, but there is no data in vascular cells. In this work we have investigated the mechanisms underlying the interaction between statins and TGF- β and whether the beneficial effects of statins in atherosclerosis are due to the modulation of the TGF- β /Smad pathway.

METHODS

Materials

Cell culture reagents (GIBCO), Simvastatin, FTI-277, GGTI-286, TRI (Calbiochem), FTS (alexix), Atorvastatin (Pfizer), Y-27632 (TOCRIS Cookson Ltd, Bristol, UK), C3 exoezyme, Fpp, Ggpp Mevalonate (Sigma-Aldrich) and TGF- β (peprotech) were used.

Animals

VSMCs from Spragle-Dawley rat thoracic aorta were obtained as previously described ¹⁶.

Protein studies

For *in vivo* studies, paraffin-embedded sections of mice aorta were studied by immunohistochemistry ¹⁷.

Western blot Antibodies employed were: pSmad2 (Cell signaling,), pSmad3 kindly donated by Dr. Leof, Mayo clinic, Baltimore, CTGF (Torrey Pines Biolabs, San Diego, CA), TGF- β (R&D), PAI-1 and TRII (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham). Negative controls without the primary antibody, or using an unrelated antibody, were included to check for nonspecific staining. For *In Vitro* studies, cells were fixed in merckofix (Merck). TGF- β -free serum (TFS) was obtained by immunoprecipitation. Briefly, decomplexed FBS was incubated with 1 μ g/ml TGF- β antibody for 1h at 37°C, then TGF- β was removed by immunocomplex precipitation. TGF- β depletion was determined by ELISA (TGF- β 1 immunoassay kit from R&D).

Transfection, DNA Constructs and promoter studies

VSMCs, in 6 well-plate, were transiently transfected with FuGENE (Roche Molecular Biochemicals) and the reporter expression vectors. Smad-dependent promoter activation was evaluated by transfection of 1 µg Smad/luc (kindly donated by Dr. Volgestein, Baltimore ¹¹) and 0.5 µg TK-renilla as internal control (Clontech). After a 24-h serum starvation step, cells were stimulated for 24 h and assayed for luciferase/renilla. To block Smad pathway activation cells were transfected with PcDNA3-FLAG-Smad7 expression vector kindly donated by Dr. Massagué, Memorial Sloan-Ketterin Cancer Center, New York, USA. To inhibit RhoA cells were transfected with GFPc1-N19-RhoA which encodes a dominant negative of RhoA fused to GFP, kindly donated by Dr. del Pozo, C.N.I.C, Madrid, Spain.

Cell death and apoptosis

For quantification of cell death, cells were seeded in 12-well plates. At defined time points, the cells were harvested by pooling non-adherent cells with adherent cells, which were detached by gentle trypsinization. Apoptosis was quantified by flow cytometry assessment of DNA content of 10.000 cells. Pooled attached and detached cells were resuspended in a cell permeabilization buffer containing: 100 µg/mL propidium iodide, 10 µg/mL RNase A, 0.05% NP-40 in PBS; incubated at 4°C for 1 h; and analyzed on the Cell Quest software. By permeabilizing the cells propidium iodide was allowed access to both dead and live cells. The absolute number of cells with decreased DNA staining, comprising apoptotic cells with fragmented nuclei, was counted.

To assess the typical nuclear changes seen in apoptosis, cells were fixed and stained with propidium iodide. After fixation propidium iodide stains both live and dead cells (more intense). Samples were mounted in Mowiol 40-88 (Sigma) and examined by a laser scanning confocal microscope (Leika).

Statistical analysis

The autoradiographs were scanned using the GS-800 Calibrated Densitometer (Quantity One, Bio-Rad, Spain). Immunohistochemistry was analyzed by Imagepro-plus, Media Cybernetics; Inc. Significance was established with SPSS 11.0 software using Tukey, LSD and Bonferroni tests. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Statins enhances Smad pathway signaling in cultured VSMC

VSMC were preincubated with Simvastatin (SV) or Atorvastatin (ATV) for 48 hours, before stimulation with TGF- β for 20 min, time necessary to observe TGF- β -induced Smad phosphorylation ¹. Both statins significantly increased, in a dose-dependent manner, TGF- β -induced Smad2 and Smad3 phosphorylation (Figure 1A). Smad transcriptional activity in response to TGF- β was higher in SV pretreated cells compare to untreated ones (Figure 1B). These results show that statins can strengthen TGF- β /Smad pathway signaling.

RhoA/ROCK pathway mediates statin-dependent enhancement of Smad activation

The cellular action of statins can be explained by the inhibition of isoprenoid intermediates of the cholesterol biosynthetic pathway, such as farnesylpyrophosphate (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP) ¹⁸, which regulate posttranslational modifications of several proteins, including the small G proteins. Several groups, including ours, have demonstrated that in VSMC statins inhibit Ras and Rho activation ^{18 19}.

Incubation with L-mevalonate, the direct HMG-CoA reductase metabolite, significantly decreased the effect of statins on TGF- β -induced Smad transcriptional activation, showing the involvement of the direct inhibition of this enzyme (Fig 1B). VSMC were pretreated with either FPP or GGPP, to evaluate if the protein involved was farnesylated or geranylgeranylated. Only GGPP markedly diminished statin-induced Smad enhancement (Fig 1B), suggesting that geranylgeranylated proteins participate in Smad regulation. One of the geranylgeranylated proteins is RhoA. To asses whether RhoA inhibition was responsible of the observed effect, VSMC were pretreated for 48 hours with the bacterial toxin C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum* which inhibits Rho GTPase activity and completely ADP-ribosylates Rho ²⁰. C3 pretreatment increased Smad3 phosphorylation induced by TGF- β (Figure 1C). ROCK is a downstream RhoA mediator. Pretreatment with the ROCK inhibitor Y-27632 enhanced Smad-dependent transcription and Smad3 phosphorylation caused by TGF- β (Figure 1B and C). These data indicate that RhoA/ROCK inhibition increased TGF- β mediate Smad activation and mimicks the effects of statins.

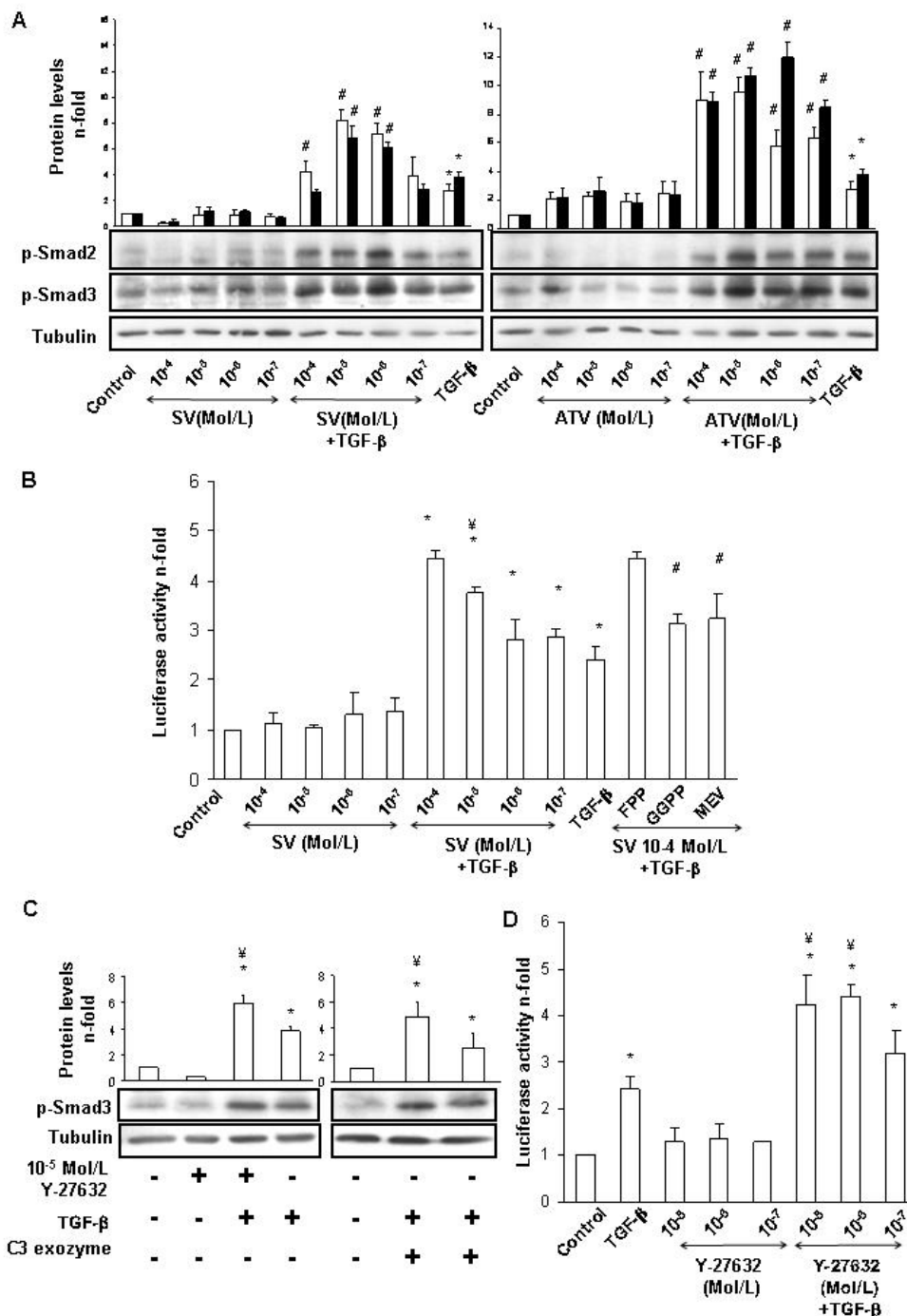


FIGURE 1: HMG-CoA reductase inhibition enhances TGF- β /Smad pathway in VSMCs. Growth arrested VSMCs were incubated for 48h with several concentrations (10^{-4} to 10^{-7} mol/L) of Simvastatin (SV) or Atorvastatin (ATV). Then, TGF- β (1 ng/mL) was added in fresh medium and phosphorylation of Smad2/3 was determined after 20 min of incubation. Figure A shows in the lower panel a representative western blot of p-Smad2, p-Smad3, or tubulin. The upper panel represents data of relative protein levels of p-Smad2 (white bars) and p-Smad3 (black bars), expressed as mean \pm SEM of 4 experiment. **B.** VSMCs, grown in serum-free medium, were transfected with a Smad-luc reporter vector for 24h. Then, cells were treated for 24h with Simvastatin (SV) or Y-27632. After that, TGF- β (1 ng/mL) was added in fresh medium and Smad-dependent transcription was measured after 24h of incubation. Some cells were pretreated for 1h with 5 μ g/mL FPP or GGPP or 10^{-4} mol/L mevalonate (Mev) before Simvastatin treatment. Luciferase activity is expressed as mean \pm SEM of 4 experiments. * vs. control. # vs. TGF- β . **C and D RhoA/ROCK inhibition increased TGF- β /Smad pathway.** Growth arrested VSMCs were incubated for 48h with Y-27632 (10^{-5} mol/L) or C3 exoenzyme (10 μ g/mL), before stimulation with TGF- β for 20 min. Figure C Representative western blot and protein levels expressed as mean \pm SEM of 4 experiments. Figure D VSMCs, grown in serum-free medium, were transfected with a Smad-luc reporter vector for 24h. Then, cells were treated for 24h with Y-27632. After that, TGF- β (1 ng/mL) was added in fresh medium and Smad-dependent transcription was measured after 24h of incubation. Luciferase activity is expressed as mean \pm SEM of 4 experiments. *p<0.05 vs. control; ¥ p<0.05 vs. TGF- β ; # p<0.05 vs. SV 10^{-4} Mol/L

Statins increase TGF- β receptor type II (TRII) and TGF- β expression in cultured vascular smooth muscle cells

Incubation with SV or ATV for 48h significantly increased, in a dose-dependent manner, TRII protein expression and TGF- β secretion (figure 2). We investigated the role of RhoA/ROCK pathway in these processes. The upregulation of TRII and TGF- β caused by statins was reversed by pre-treatment with either mevalonate or GGPP, but not with FPP (Figure 2A and B). Incubation for 48h with geranylgeranyl transferase inhibitor GGTI-286, but not with farnesyl transferase inhibitor FTI-277, increased TRII protein levels, mimicking the effects of statins (Figure 2C). Inhibition of RhoA and ROCK, by C3 and Y-27632, respectively, increased the expression of TRII and TGF- β release (Figure 2C and D). These data show that in VSMCs statins, via RhoA/ROCK pathway, increased TRII expression and TGF- β synthesis.

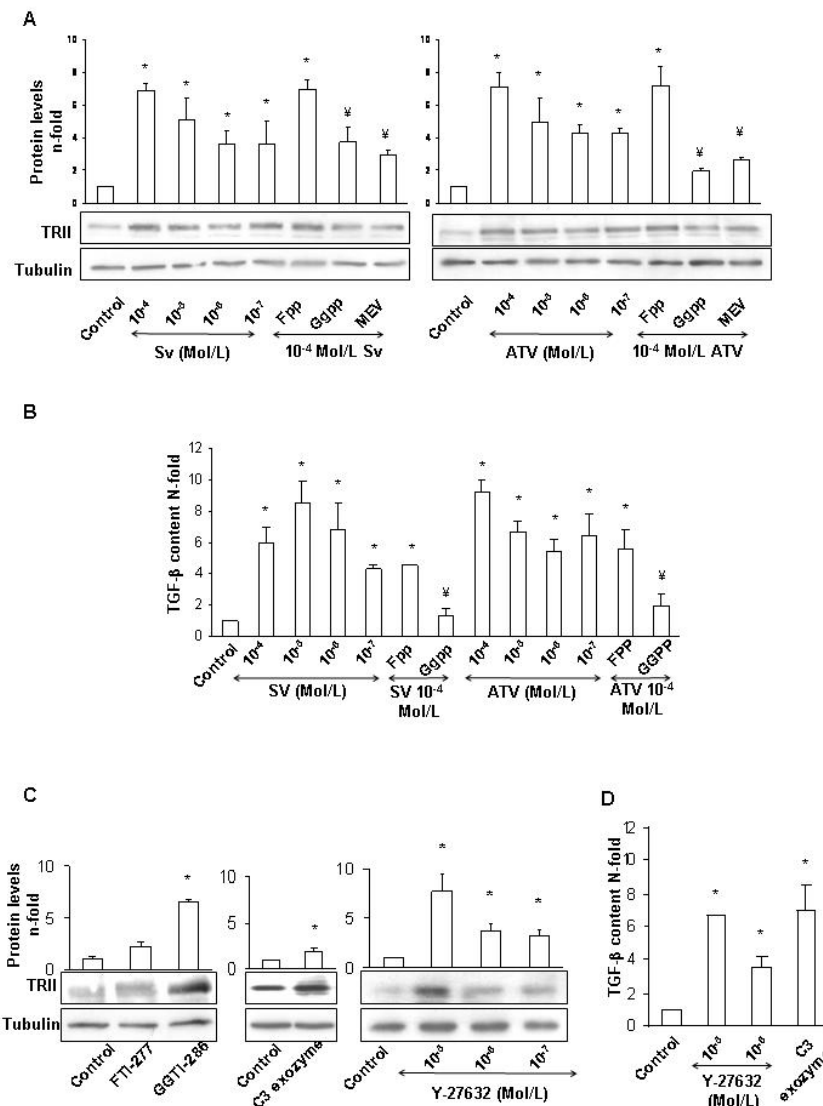


FIGURE 2: Statins upregulate TGF- β receptor type II (TRII) (A) and TGF- β synthesis in VSMCs (B). Growth arrested VSMCs were incubated for 48h with several concentrations (10⁻⁴ to 10⁻⁷ mol/L) of Simvastatin (SV) or Atorvastatin (ATV). Some cells were pretreated for 1h with 5 μ g/mL FPP or GGPP or 10⁻⁴ mol/L mevalonate (MEV) before statin treatment. **RhoA/ROCK inhibition increases TRII (C) and TGF- β synthesis (D).** Growth arrested VSMCs were incubated for 48h with FTI-277 or GGTI-286 (10⁻⁵ mol/L), Y-27632 (10⁻⁵ to 10⁻⁷ mol/L) or C3 exoenzyme (10 μ g/mL). Figures A and C show in the lower panel representative western blot of TRII expression and in the upper panel relative TRII protein levels expressed as mean \pm SEM of 4 experiments. Figures B and D show TGF- β content measured in conditioned media by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM of n-fold of increase vs unstimulated cells from 4 experiments. *p<0.05 vs. control; # p<0.05 vs. SV10⁻⁴ Mol/L

TGF- β mediates the cell death induced by statins

Next, we have evaluated whether interactions between statins and TGF- β /Smad pathway could contribute to the effects of statins in atherosclerosis.

Studies in VSMCs have shown that statins cause apoptosis. This effect is higher in the presence of FBS than in serum-free conditions ¹⁹. As FBS contains TGF- β we evaluated whether statin-induced apoptosis was mediated by TGF- β . VSMCs were incubated in two different conditions: FBS or TGF- β -free FBS (TFS), obtained by immunoprecipitation. Treatment with SV or ATV for 48 hours in 10% FBS caused a significant increase in cell death, which was higher than with TFS (Figure 3A). In 10% FBS, the blockade of TGF- β action, using a specific TRI kinase inhibitor (ALK5i), significantly diminished SV-induced VSMC death (figure 3A). These data suggest that TGF- β present in serum was responsible for Statin-induced cell death.

Secondly, we have investigated the direct effect of TGF- β on statin-induced apoptosis in serum-free medium. In control experiments, we have determined that TGF- β content of 10% FBS was 1ng/ml (not shown, evaluated by ELISA). After 48h of treatment with SV or ATV in 0%FBS there was a slight induction of VSMC death, which was dramatically increased when cells were co-incubated with 1ng/ml TGF- β (figure 3B). This data shows a synergistic effect of TGF- β and statins on VSMC apoptosis.

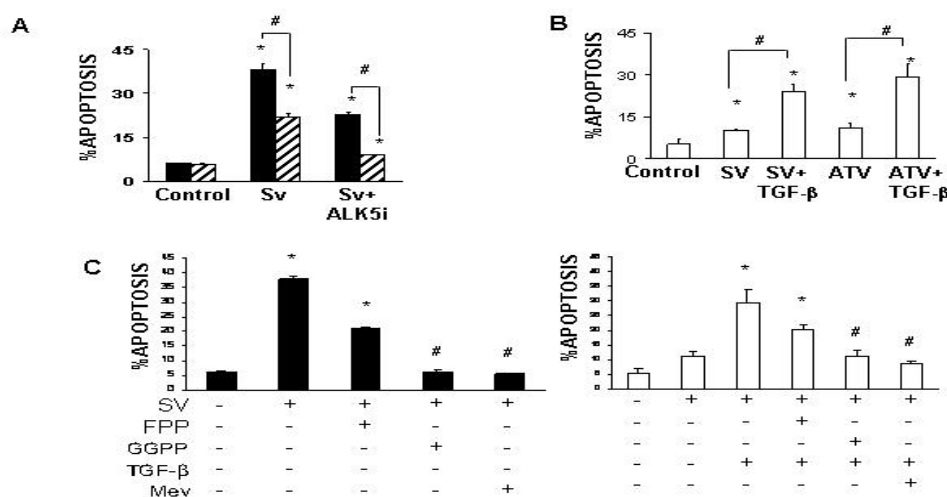


FIGURE 3: TGF- β mediates statins-induced VSMC apoptosis in 10% FBS. **A.** VSMCs were incubated with 10% FBS media or with 10% TGF- β -free FBS (TFS). Cells were treated with 10^{-4} Mol/L of Simvastatin (SV) for 48h. Some cells were preincubated for 1h with the TGF- β type I receptor (ALK5) inhibitor ALK5i (10^{-5} Mol/L) before Simvastatin treatment. **B. TGF- β increases statin-induced VSMC apoptosis in serum-free medium.** Growth arrested cells were treated with 10^{-4} Mol/L of either Simvastatin (SV) or Atorvastatin (ATV) alone or in combination with 1ng/ml TGF- β for 48h in serum-free conditions. The graphs show the percentage of hypodiploid cells expressed as mean \pm SEM of 4 experiments. Black bars represent: FBS treated cells; striped bars, cells in TGF- β -free FBS (TFS); and white bars, cells in serum-free medium. * $p < 0.05$ vs. control. # $p < 0.05$ vs. TGF- β -free FBS. + $p < 0.05$ vs. statin alone. **RhoA mediates Simvastatin-induced VSMC death.** VSMCs were incubated in serum-free conditions (white bars) or in 10%FBS medium (black bars). **C** Cells were treated with 10^{-4} mol/L Simvastatin (SV) alone or in combination with 1ng/ml TGF- β for 48h. Some cells were pretreated for 1h with 5 μ g/ml FPP or GGPP or 10^{-4} mol/L mevalonate (MEV) before Simvastatin treatment. * $p < 0.05$ vs. Control; # $p < 0.05$ vs. SV 10^{-4} Mol/L

RhoA mediates statin-dependent cell death

We have evaluated whether the synergistic effect of TGF- β and statins on VSMC apoptosis observed in serum-free conditions was attributable to an inhibition of the geranylgeranylated protein RhoA. In VSMC, preincubation with L-mevalonate or GGPP, but not FPP, completely abolished SV-induced cell death (figure 3A). Treatment with C3 alone for 48 h markedly increased TGF- β -mediated cell death (figure 3B). These data indicate that RhoA inhibition increased TGF- β mediated apoptosis.

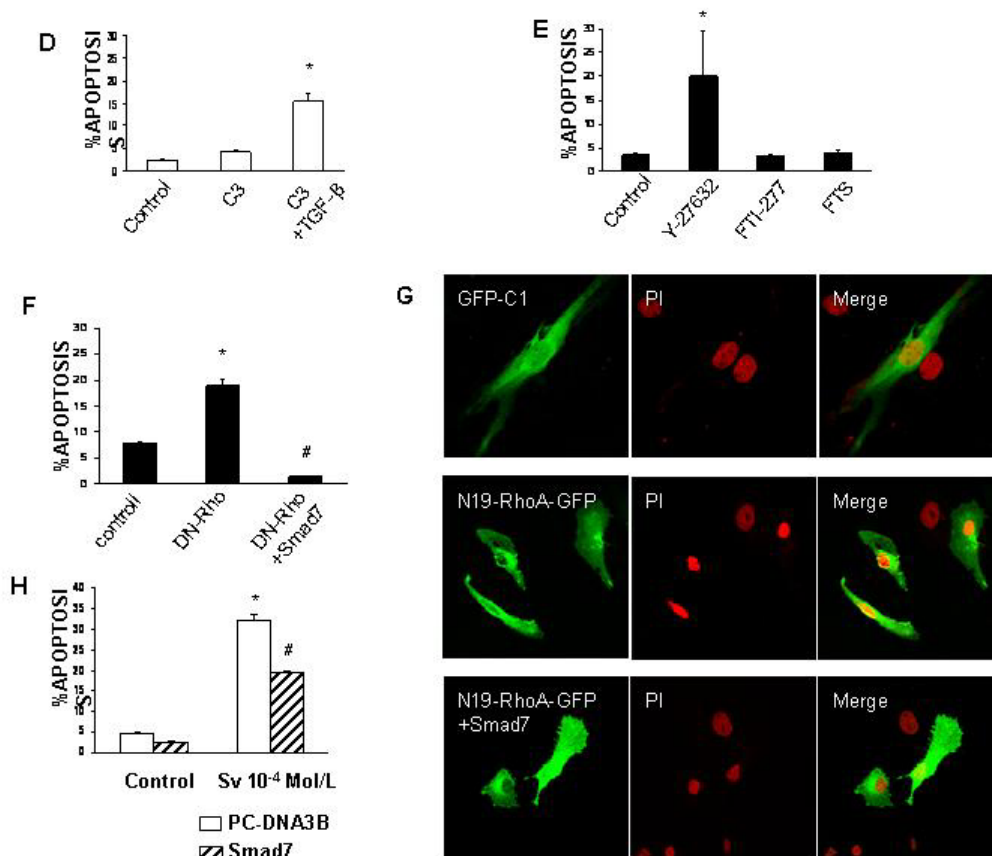


FIGURE 3: TGF- β mediates statins-induced VSMC apoptosis. **D.** Cells incubated in serum-free medium were treated with C3 exoenzyme alone or in combination with 1ng/mL TGF- β for 48 h. **E.** Cells incubated in 10%FBS were treated with Y-27632 (10⁻⁴ Mol/L), FTI-277 (10⁻⁴ Mol/L) or FTS (10⁻⁴ Mol/L) for 48h. Figures A, B and C show percentage of hypodiploid cells expressed as mean \pm SEM of 4 experiments. **F and G.** Cells grown in 10%FBS were transfected with a GFP overexpressing vector or with a vector that overexpress DN-RhoA fused to GFP (N19-RhoA-GFP). Some cells were cotransfected with a Smad7 overexpressing vector. After 24h of transfection apoptotic profile was evaluated. Figure D shows the percentage of hypodiploid cells expressed as mean \pm SEM of 4 experiments. Figure E shows representative cells obtained with confocal microscopy. Cells were fixed and stained with propidium iodide and mounted in mowiol. Apoptotic nuclei are bright and condensed (arrows) and transfected cells appear in green. **H. Smad pathway is involved in Simvastatin induced cell death.** Cells grown in 10%FBS were transfected with either control PC-DNA3B plasmid, or with a Smad7 overexpressing vector for 24h. Then cells were treated for 48h with 10⁻⁴ mol/L Simvastatin. Figure shows the percentage of hypodiploid cells expressed as mean \pm SEM of 6 experiments. *p<0.05 vs. control #p<0.05 vs. pc-DNA3B transfected cells.

In the presence of 10% FBS, several groups, including ours, have shown that small G proteins participate in cell growth regulation by statins^{19, 21}. We have confirmed that GGPP completely abolishes statin-induced cell death showing the involvement of a geranylgeranylated protein. The reversion observed with FPP in 10% FBS was higher than in serum-starving conditions (figure 4A). Treatment with two different farnesyl transferase inhibitors, FTI-277 or farnesylthiosalicylic acid, for 48h did not induced VSCM death (figure 3E). These data indicate that in proliferative conditions farnesylated proteins are not involved in statin-induced apoptosis, but they could contribute to survival in proliferative conditions. We further explored the role of RhoA in cell growth regulation. In 10% FBS, the blockade of RhoA, by transfection with a DN-RhoA expression vector or by ROCK inhibition with Y-27632, significantly increased cell death (figure 3E). These data indicates that RhoA/ROCK pathway is involved in statins-induced apoptosis.

Smad pathway is involved in Simvastatin induced VSMC death

To evaluate the involvement of Smad pathway in Statin-induced cell death in 10% FBS, cells were transiently transfected with a Smad7 overexpressing vector, that inhibits TGF- β /Smad-mediated transcriptional effects by interfering with receptor-mediated activation of R-Smad²². Were cotransfected with GFP overexpressing vector to detect transfected cells. Smad7 overexpression ameliorated statin-induced cell death, compared to cells transfected with an empty vector pcDNA3B (figure 3F), suggesting that Smad pathway is driving statin-induced cell death. Moreover, cotransfection with DN-RhoA and Smad7, significantly suppressed cell death induced by DN-RhoA (Figure 3F and G). This indicates that RhoA inhibition induces cell death by the action of TGF- β through Smad pathway.

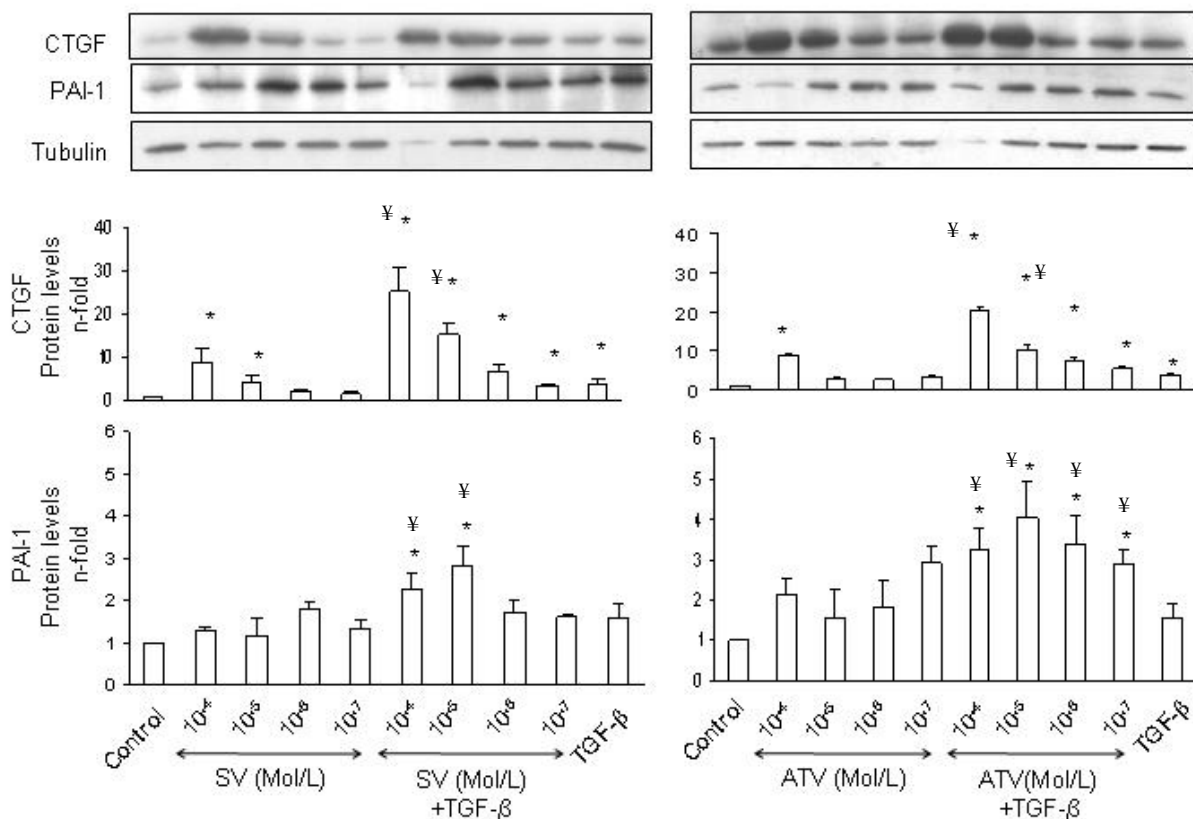
Statins enhance the expression of TGF- β dependent ECM regulatory proteins

We evaluated two different ECM regulatory proteins: CTGF, as a profibrotic mediator^{1, 23, 24}, and PAI-1, as an inhibitor of ECM degradation [cita]. Atorvastatin and simvastatin enhanced, in a dose-dependent manner, TGF- β -dependent CTGF and PAI-1 upregulation (Figure 5A).

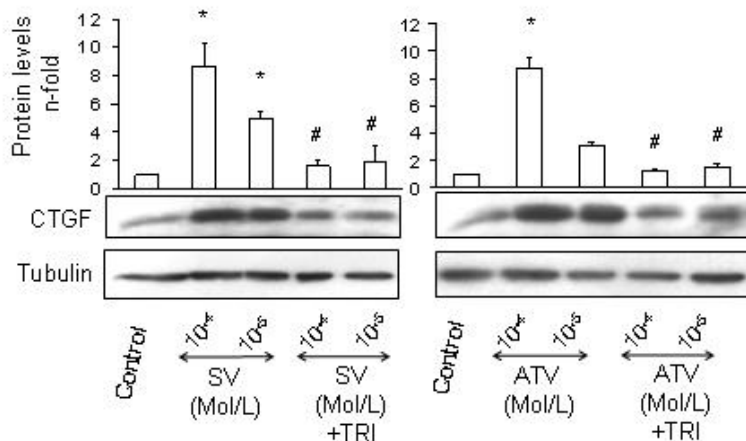
We observed that high concentration of statins alone strongly increase CTGF production. We further investigate whether TGF- β is the mediator of statin-induced CTGF overexpression. The blockade of TGF- β with ALK5i completely inhibited CTGF production (Figure 5B), indicating that endogenous TGF- β regulates CTGF overproduction. CTGF has been reported to induce apoptosis in VSMCs²⁴. We assessed the involvement of CTGF using an antisense oligonucleotide for CTGF mRNA to avoid endogenous production.

We observed that when CTGF production was blocked simvastatin/TGF- β -induced cell death was inhibited; suggesting that CTGF is a mediator of this process.²⁴ (Figure 4C).

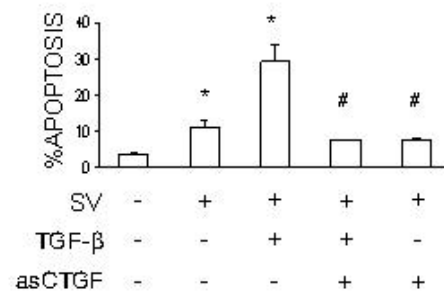
A



B



C



¥

Figure 4: Statins enhance TGF- β dependent ECM regulatory proteins upregulation in VSMCs. Growth arrested VSMCs were preincubated for 48h with several concentrations (10⁻⁴ to 10⁻⁷ mol/L) of Simvastatin (SV) or Atorvastatin (ATV), and then stimulated with TGF- β (1 ng/mL) for 24h. These cells were compared with those treated with TGF- β in the absence of statin pretreatment. Figure shows in the upper panel representative western blot and in the lower panel relative CTGF, PAI-1. **B. Endogenous TGF- β is involved in Statin-induced CTGF expression.** Some cells were incubated for 1 h with 10⁻⁵ mol/L of ALK5i and then treated with high concentrations of either SV or ATV for 72h. Figure shows a representative western blot in the lower panel and in the upper panel the media \pm SEM of 4 experiments. **C. Endogenous CTGF is involved in Statins/TGF- β -induced apoptosis.** VSMCs were treated with an antisense oligonucleotide for CTGF; afterward some cells were incubated for 48h with SV. Figure shows the percentage of hypodiploid cells expressed as mean \pm SEM of 3 experiments. *p<0.05 vs. control; ¥p<0.05 vs. TGF- β ; #p<0.05 vs. SV10⁻⁴ Mol/L

DISCUSSION

In the present work we have described a close relationship between statins and TGF- β in different aspects of the atherosclerotic process. We report for the first time that statins enhance Smad pathway activation by TGF- β . In addition, statins also induced TRII upregulation and TGF- β synthesis in VSMC, leading to an increase in TGF- β -dependent actions. In this sense, statins render VSMCs more susceptible to TGF- β induced apoptosis, and increase TGF- β dependent ECM regulatoryprotiens production.

The Smad pathway is the main signaling pathway for TGF- β . We have observed that two statins, simvastatin and atorvastatin increased the activation of Smad pathway caused by TGF- β . In VSMC statins enhanced TGF- β -induced Smad2 and Smad3 phosphorylation and Smad-dependent gene transcription. The Smads interact with transcription factors at the promoters of some genes and regulate their transcription ²²[+]. TGF- β through Smad activation pathway regulates many cellular responses, including cell growth, cell survival, cell differentiation and ECM accumulation ²². These processes are subject to regulation by other signaling pathways, such as MAPK²². Many studies have demonstrated that statins inhibit many different intracellular pathways, including activation of transcription factors , such as nuclear factor- κ B, small G proteins, and activation of protein kinases, like MAPK and ROCK ¹⁸[+]. Statins, through the inhibition of these pathways, regulates cellular responses, including anti-inflammatory properties, and therefore exert beneficial effects in atherosclerosis ¹⁸[+]. We have found that statins enhanced TGF- β /Smad pathway. Smad proteins are nuclear factors that depend on the cellular context to produce their responses ²². Since statins has a protective role in atherosclerosis our data indicate that statins prepare the cellular context for a protective effect of Smad proteins.

It has been reported differential TGF- β receptors expression in VSMC from normal vessels and atherosclerotic plaques ^{11, 25}. Atherosclerotic plaque derived cells have almost no expression of TRII compare to cells derived from normal vessels, indicating a change in the phenotype of VSMC during atherosclerosis ^{11, 26, 27}. We have found that in VSMC statins increased TRII expression, showing that statins can induce a phenotype reversion from disease type VSMC to a normal phenotype, and this could be an explanation of their beneficial effects.

We have also found that statins increased TGF- β synthesis in VSMC. This local production of TGF- β could participate in the beneficial effects of statins. In atherosclerosis TGF- β has been considered as a “protective cytokine”, as it plays an important role in maintaining normal vessel wall structure and controls the balance between inflammation and ECM deposition ⁷. The loss of this protective effect, attributed to

changes in TGF- β receptors profiles and modulated by local TGF- β levels, contributes to the development of atherosclerosis. Studies done by Graiger et al support this hypothesis. In experimental models the lack of TGF- β signaling promotes the development of atherosclerotic lesions and unstable plaques⁶⁻⁸. In human carotid plaques, a higher expression of TGF- β in asymptomatic lesions compare to symptomatic has been found. TGF- β was mainly expressed in plaque shoulder and associated with a comparable increase in plaque procollagen and collagen content, and provides evidence that TGF- β may play an important role in the process of plaque stabilization²⁸.

The cellular action of statins can be explained by the inhibition of isoprenylation of several proteins, including small G proteins¹⁸. In VSMC, we have found that preincubation with L-mevalonate and GGPP markedly diminished statins-induced Smad activation and overexpression of TRI and TGF- β , indicating the involvement of a geranylgeranylated protein in these processes. Moreover, these results can be similarly reproduced using RhoA/ROCK inhibitors (by C3 pretreatment or ROCK inhibition with Y-27632), indicating that statin effects can be attributed to RhoA/ROCK inhibition.

Atherosclerosis is a very complex process that comprises endothelial dysfunction, inflammation, matrix alterations and neointima formation. Statins have demonstrated beneficial clinical effects that included amelioration of endothelial dysfunction, inflammation and increased plaque stability^{13,29}. One of the key steps, and probably involved in the origin of atherosclerosis is VSMC proliferation. Recent therapeutic strategies have focused on inhibiting VSMC proliferation³⁰. There is a controversial discussion about the goodness of VSMC apoptosis. Some authors have reported that those treatments that increase VSMC apoptosis are good to treat atherosclerosis³⁰, however a recent study has raised that VSMC apoptosis by itself is not beneficial for atherosclerotic regression^{31, 32}. They show that apoptosis increases plaque instability inducing plaque rupture³¹. According to this controvert yield, statin have been showed to induce VSMC apoptosis^{19, 21} even though their beneficial effects. In VSMC, cocubation of TGF- β and SV or ATV for 48 hours in serum-free medium caused a marked increase in apoptosis compare to each stimuli alone, via RhoA inhibition, showing that in growth-arresting conditions statins makes VSMC more susceptible to TGF- β induced apoptosis. We have found that in the presence of 10%FBS, statin-induced VSMC apoptosis is mediated by TGF- β /Smad pathway. Experiments with TGF- β -free serum and blocking TGF- β action by a specific TRI kinase inhibitor showed that TGF- β present in serum was responsible for Statin-induced cell death. The blockade of Smad activation, by Smad7 overexpression, diminished Statin and DN-RhoA-induced VSMC apoptosis. This indicates that statins and RhoA inhibition induces cell death by the action of TGF- β through Smad pathway.

TGF- β seems to be an important stabilizing factor and prevents plaque rupture through the decrease of matrix metalloproteinases, as shown in human plaques³³. We have found that statins increases TGF- β -induced ECM accumulation, as shown by overexpression of the profibrotic mediator CTGF, and the inhibitor of ECM degradation PAI-1. These results could be attributable to the increase in TRII and TGF- β /Smad pathway, given that Smad pathway has been implicated in the regulation of these ECM proteins^{34 35}.

It has been shown in the literature that statins are one of the best drugs in the treatment of atherosclerosis^{12, 13, 36}. Here we report for the first time that a key player in their actions is TGF- β . This gives light to statin mechanisms. Till now it has been speaking about pleiotropic effects in relation to inhibition of isoprenylation, but in this work pleiotropic effects offer a new face. We show that those effects are mediated by TGF- β through its main signaling pathway, the Smad proteins. This pathway is almost the only pathway not just not inhibited but enhanced by statins. Thus, treatment with Statins will inhibit small G-proteins, but enhance Smad pathway driving TGF- β response through this pathway. This will lead to an increase in VSMC apoptosis, but with a increase in ECM accumulation, inhibition of MMPs by PAI-1 induction, leading to a more controlled cell death which will ameliorate atheroma plaque without increasing its weakness. This leads to a stable regression of atheroma plaque (Fig esquema). In conclusion we demonstrate that statin take TGF- β as a key effector, potentiating Smad signaling pathway. This is the first time showing a direct effect of statin in TGF- β /Smad pathway that explains some of the pleiotropic effects described in statin mechanisms.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by grants from (SAF 2005-03378) of the Ministerio de Educación y Ciencia and Red temática de Investigación Renal, REDINREN (ISCIII-RETIC RD06/0016/0004) of the Instituto de Salud Carlos III from Ministerio de Sanidad y Consumo. J. R-V and E. S-L are fellows of FIS. E S-G is a fellow of the Fundación Conchita Rábago. G C-G is a fellow of the Fundación Carolina. We want to thank M^a Mar Gonzalez Garcia-Parreño and Sandra Lopez for technical help with confocal microscopy, and histochemistry, respectively.

Reference List

1. Ruiz-Ortega,M., Rodriguez-Vita,J., Sanchez-Lopez,E., Carvajal,G., & Egido,J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc. Res.* **74**, 196-206 (2007).
2. Leask,A. & Abraham,D.J. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* **18**, 816-827 (2004).
3. Smith,J.D. *et al.* Soluble transforming growth factor-beta type II receptor inhibits negative remodeling, fibroblast transdifferentiation, and intimal lesion formation but not endothelial growth. *Circ. Res.* **84**, 1212-1222 (1999).
4. Ryan,S.T., Koteliansky,V.E., Gotwals,P.J., & Lindner,V. Transforming growth factor-beta-dependent events in vascular remodeling following arterial injury. *J. Vasc. Res.* **40**, 37-46 (2003).
5. Grainger,D.J. TGF-beta and atherosclerosis in man. *Cardiovasc. Res.* **74**, 213-222 (2007).
6. Mallat,Z. *et al.* Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ. Res.* **89**, 930-934 (2001).
7. Lutgens,E. *et al.* Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 975-982 (2002).
8. Robertson,A.K. *et al.* Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J. Clin. Invest* **112**, 1342-1350 (2003).
9. Sanchez-Capelo,A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 15-34 (2005).
10. Sawyer,J.S. *et al.* Synthesis and activity of new aryl- and heteroaryl-substituted pyrazole inhibitors of the transforming growth factor-beta type I receptor kinase domain. *J. Med. Chem.* **46**, 3953-3956 (2003).
11. McCaffrey,T.A. *et al.* Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. *J. Clin. Invest* **96**, 2667-2675 (1995).
12. Nissen,S.E. *et al.* Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* **295**, 1556-1565 (2006).
13. Ehrenstein,M.R., Jury,E.C., & Mauri,C. Statins for atherosclerosis--as good as it gets? *N. Engl. J. Med.* **352**, 73-75 (2005).
14. Porreca,E., Di,F.C., Baccante,G., Di,N.M., & Cuccurullo,F. Increased transforming growth factor-beta(1) circulating levels and production in human monocytes after 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase inhibition with pravastatin. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1752-1757 (2002).
15. Park,H.J. & Galper,J.B. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors up-regulate transforming growth factor-beta signaling in cultured heart cells via inhibition of geranylgeranylation of RhoA GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11525-11530 (1999).
16. Lorenzo,O. *et al.* Angiotensin III activates nuclear transcription factor-kappaB in cultured mesangial cells mainly via AT(2) receptors: studies with AT(1) receptor-knockout mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 1162-1171 (2002).
17. Ruperez,M. *et al.* Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation* **108**, 1499-1505 (2003).
18. Liao,J.K. & Laufs,U. Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 89-118 (2005).
19. Gujjarro,C. *et al.* 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ. Res.* **83**, 490-500 (1998).
20. Sekine,A., Fujiwara,M., & Narumiya,S. Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **264**, 8602-8605 (1989).
21. Blanco-Colio,L.M. *et al.* 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* **161**, 17-26 (2002).

22. Massague,J. & Wotton,D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* **19**, 1745-1754 (2000).
23. Cicha,I. *et al.* Connective tissue growth factor is overexpressed in complicated atherosclerotic plaques and induces mononuclear cell chemotaxis in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1008-1013 (2005).
24. Hishikawa,K. *et al.* Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* **100**, 2108-2112 (1999).
25. Ishigami,M., Swertfeger,D.K., Hui,M.S., Granholm,N.A., & Hui,D.Y. Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1020-1026 (2000).
26. McCaffrey,T.A. *et al.* The expression of TGF-beta receptors in human atherosclerosis: evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J. Mol. Cell Cardiol.* **31**, 1627-1642 (1999).
27. McCaffrey,T.A. *et al.* Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J. Clin. Invest* **100**, 2182-2188 (1997).
28. Cipollone,F. *et al.* Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke* **35**, 2253-2257 (2004).
29. Liao,J.K. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int. J. Cardiol.* **86**, 5-18 (2002).
30. Dzau,V.J., Braun-Dullaeus,R.C., & Sedding,D.G. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **8**, 1249-1256 (2002).
31. Clarke,M. & Bennett,M. Defining the role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis. *Cell Cycle* **5**, 2329-2331 (2006).
32. Clarke,M.C. *et al.* Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat. Med.* **12**, 1075-1080 (2006).
33. Borrelli,V. *et al.* Role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta1 the in the regulation of metalloproteinase expressions. *Surgery* **140**, 454-463 (2006).
34. Datta,P.K., Blake,M.C., & Moses,H.L. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor-beta -induced physical and functional interactions between smads and Sp1. *J. Biol. Chem.* **275**, 40014-40019 (2000).
35. Leask,A., Holmes,A., Black,C.M., & Abraham,D.J. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **278**, 13008-13015 (2003).
36. Nissen,S.E. *et al.* Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* **291**, 1071-1080 (2004).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. La ET-1 induce CTGF en CMLV cultivadas para promover la producción de proteínas de la MEC.

Muchos estudios han demostrado que la ET-1 contribuye a los cambios estructurales aórticos observados durante las enfermedades cardiovasculares proliferativas. Nuestros resultados muestran claramente que en CMLV cultivadas, la ET-1 aumenta la expresión del ARNm, la actividad de promotor y la producción de CTGF. La ET-1 es un agente vasoactivo y mitogénico para las CMLV y contribuye a la acumulación de la MEC a través de la regulación del colágeno tipo I y la FN^{133, 150, 185, 186}. El CTGF induce la síntesis de estas proteínas de la MEC y se cree que desempeña un papel clave en la patogénesis de la fibrosis⁷⁵. En esta tesis se ha observado que en CMLV la ET-1 indujo la producción de CTGF. Dicha producción se mantuvo incluso hasta las 72h. En diferentes modelos experimentales, incluyendo aterosclerosis e hipertensión, el aumento del CTGF y la ET-1 en los distintos tejidos afectados se ha asociado con la presencia de fibrosis^{15, 31, 56, 174, 203}. El bloqueo del CTGF endógeno, con un oligonucleótido antisentido, disminuyó la síntesis de FN y procolágeno tipo I inducidos por la ET-1, sugiriendo que el CTGF podría ser un mediador de la acumulación de MEC causada por la ET-1 en las enfermedades vasculares.

Diversos estudios han defendido que el CTGF es un factor profibrótico duradero en el tiempo. En un modelo de fibrosis en la piel, los niveles de ARNm de CTGF se mantuvieron elevados en las áreas de fibrosis¹⁵⁸. Además, la inyección de CTGF en la piel induce la formación de tejido fibroso⁵⁷ y la coinyección de CTGF y TGF- β provoca una fibrosis persistente y sostenida¹⁵⁸. En CMLV en cultivo, tanto el estiramiento mecánico como factores de crecimiento como el TGF- β , la Ang II y como se muestra en este trabajo la ET-1, regulan positivamente el CTGF y proteínas de la MEC. Dicha producción de proteínas de las MEC se revierte con el bloqueo de la producción del CTGF endógeno^{87, 203, 265}. Todos estos datos muestran que CTGF es un mediador de la fibrosis causada por factores mecánicos o relacionados con el crecimiento, como la ET-1, y que la regulación del CTGF desempeña un papel clave en el proceso de acumulación de MEC en condiciones patológicas.

La ET-1 actúa a través de dos receptores, ET_A y ET_B, ambos expresados en CMLV^{133, 185}. El ET_A media la mayoría de los efectos patológicos de ET-1, incluyendo crecimiento celular y fibrosis. El antagonista de ET_A BQ123 inhibió de manera significativa *In Vitro* los efectos estimulantes del crecimiento de ET-1^{186, 261}. Sin embargo, en estadios patológicos, como hipercolesterolemia, el efecto principal de la activación del receptor ET_B podría ser vasoconstricción, amplificando las respuestas dependientes de ET-1⁸¹. En fibroblastos en cultivo ambos receptores, ET_A y ET_B, participan en la síntesis de colágeno⁷². En

esta tesis hemos obtenido que en CMLV la ET-1 regula positivamente el gen de CTGF a través de los receptores ET_A, utilizando antagonistas y agonistas específicos de ET_A y ET_B.

Numerosos datos indican que la ET-1 participa en la aterosclerosis. En CMLV procedentes tanto de aorta normal como enferma se ha observado una gran presencia ET-1¹¹. También se han encontrado altos niveles de expresión de ET-1 en placas ateroscleróticas humanas en comparación con vasos normales¹¹. Asimismo en pacientes que han sufrido una angioplastia se ha observado un aumento en los niveles de ET-1⁷⁹. La liberación de ET-1 está estimulada por el daño vascular y por LDL oxidadas aterogénicas incluso cuando el endotelio permanece intacto²⁴. Nuestros resultados muestran que en CMLV en cultivo, ET-1 a una dosis entre 10⁻⁸ y 10⁻⁹ mol/L incrementa el ARNm y la producción de CTGF. Se ha descrito que los niveles de ET-1 en plasma están alrededor de 1 a 2 pg/mL¹⁸⁵, y también que los niveles tisulares aumentan durante el daño vascular^{133, 185} lo que sugiere que la producción local de ET-1 en vasos dañados podría contribuir a la acumulación de MEC observada en las enfermedades vasculares a través de la producción de CTGF por las CMLV. El bloqueo de ET_A inhibe la hiperplasia de la neointima después de daño por balón y por cánula, atenuando la proliferación de los miofibroblastos adventicios, así como la proliferación de las CMLV y la formación de MEC¹⁸. Asimismo, el bloqueo de ET_A disminuye el desarrollo de aterosclerosis en modelos experimentales de hipercolesterolemia¹⁵⁴ y en ratones carentes de apolipoproteína E¹⁴. En ratas diabéticas, el tratamiento con bosentan, el cual bloquea tanto ET_A como ET_B, redujo significativamente el grosor de la media, la relación pared/luz, el infiltrado celular y la acumulación de MEC⁶⁵, indicando que la ET-1 podría mediar los cambios vasculares observados en diabetes experimental.

La ET-1 parece estar implicada en la hipertensión humana y en la hipertensión experimental⁵⁷. En pacientes moderadamente hipertensos el antagonista dual de ET_A y ET_B bosentan reduce la presión arterial de manera similar a un iECA⁵⁷. En la fase temprana de un modelo de hipertensión inducida por sal de acetato de deoxicorticosterona (DOCA-salt) la ET-1, vía el receptor ET_A, activa el TGF-β y aumenta la FN y el depósito de colágeno en el corazón¹¹, mientras que el ET_B protege contra los daños vasculares y renales⁷². Los efectos de los antagonistas de la ET-1 pueden deberse a las acciones directas de la ET-1 sobre las CMLV. A este respecto, en esta tesis hemos obtenido que la ET-1 activa a las CMLV para que produzcan CTGF, el cual es mediador de la sobreexpresión de FN y Col-1. nuestros datos revelan un nuevo mecanismo que podría explicar los efectos beneficiosos del bloqueo de ET_A en hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativos participan en la señalización celular y regulan un número importante de eventos celulares, incluyendo fibrosis y aterosclerosis⁵. La ET-1 puede inducir la formación de ROS en diferentes tipos celulares, como CMLV^{133, 185}. En la hipertensión por DOCA-salt la generación de ROS se redujo por el bloqueo de ET_A²⁷. En la hipertensión por mineralocorticoides asociados a niveles bajos de renina (low-renin mineralocorticoid) la ET-1 aumenta la producción de superóxido, por lo menos en parte, vía activación de la ruta ET_A/NADPH oxidasa¹²⁵. en esta tesis se examinó el efecto del DPI, un potente inhibidor de las enzimas que contienen flavonoides,

como la NADPH oxidasa y el secuestrador de O_2^- , TIRON. En CMLV cultivadas hemos observado que ambos antioxidantes inhibieron la producción de CTGF estimulada por ET-1, lo que sugiere la implicación de un mecanismo redox en la regulación de CTGF.

ET-1 activa varios mediadores intracelulares, entre ellos están las proteínas G pequeñas¹³³⁻¹⁸⁵. La familia de proteínas de unión a GTP, Rho, contiene muchas proteínas geranilgeraniladas que desempeñan un papel muy importante en la adhesión celular, dinámica de actina, o regulación de la transcripción génica. Dentro de esta familia se incluyen las proteínas Rho, Rac, y Cdc42²³⁹. En CMLV, hemos observado que la ET-1 activa RhoA, provocando el cambio en la localización de la RhoA pasando del citoplasma a la membrana plasmática para poder unirse a su efector. Las proteínas Rho regulan varios genes incluido el de la ET-1 y algunas citoquinas²³⁹, un mecanismo potencial que podría explicar los cambios vasculares observados en la hipertensión es el incremento del sistema Rho/quinasa el cual causa vasoconstricción²²⁰. La inhibición de la actividad de RhoA por el exoezima C3 o a la inhibición de la quinasa asociada a Rho (ROCK) por el compuesto Y27632 o fasudil evitó la inducción de CTGF por ET-1. En el daño vascular inducido por L-NAME, el inhibidor de Rho (Y-27632), disminuyó la inflamación vascular y la progresión de la aterosclerosis¹⁰³. Nuestros resultados indican que, en CMLV en cultivo, el péptido vasoactivo ET-1 aumenta la expresión de ARNm y la producción de CTGF vía proteínas Rho. La ET-1 estimula la ruta de las MAPK incluyendo la cascada de las ERK, las proteínas quinastas activadas por estrés y la cascada de la MAPK p38. Estas rutas se han asociado a diferenciación, hipertrofia y fibrosis¹⁴⁹. En esta tesis hemos observado que la activación de la ERK es necesaria para la producción de CTGF inducida por ET-1 pero no la activación de p38. También hemos observado que la generación de ROS y la activación de la quinasa de Rho intervienen en la fosforilación de ERK dependiente de ET-1, indicando que la producción de CTGF está inducida por una activación de ERK dependiente de ROS y la ROCK. En CMLV en cultivo, el estiramiento mecánico y factores de crecimiento como TGF- β , Ang II y, como mostramos en esta tesis, la ET-1, promueven la expresión de CTGF¹⁸⁰. La regulación de CTGF puede estar mediada por producción de factores de crecimiento, en este sentido el TGF- β media la producción de CTGF inducida por Ang II²⁵¹. Algunos datos sugieren la relación entre TGF- β y ET-1. El bloqueo de los receptores de ET-1 disminuyó la producción de TGF- β en tejidos cardiacos, renales y vasculares^{7, 24, 200}. El TGF- β induce la síntesis de ET-1¹⁵⁶. Sin embargo, nuestros resultados muestran que en CMLV de rata la ET-1 no produjo TGF- β . Además el bloqueo del TGF- β endógeno no disminuyó la producción de CTGF inducida por ET-1. Estos datos indican claramente que la ET-1 induce CTGF de manera independiente de TGF- β . Las nuevas estrategias para bloquear la fibrosis podrían dirigirse a la inhibición del CTGF, mejor que del TGF- β , dado su función más específica en la regulación de la MEC, sin afectar a la respuesta inflamatoria, algo que no ocurre con el bloqueo del TGF- β ya que presenta propiedades inmunomoduladoras de las células más importantes para la formación de la lesión, incluyendo CE, CMLV, macrófagos y células T⁵. Nuestros datos muestran que la ET-1 regula el CTGF y la fibrosis independientemente del TGF- β , apoyando la búsqueda de nuevas terapias antifibróticas que bloqueen el CTGF.

La Ang II y la ET-1 comparten algunas respuestas celulares, como vasoconstricción, proliferación celular y acumulación de MEC. Se ha descrito que la Ang II activa el TGF- β y que este factor media la producción de CTGF. Sin embargo, nuestros datos muestran un papel diferente del TGF- β en la regulación de CTGF causada por ambos péptidos. La Ang II regula la producción de ET-1 por la ruta de la ERK a través de un mecanismo redox²⁷. En esta tesis se muestra que el antagonista de ET_A BQ-123 disminuyó la producción de CTGF inducida por Ang II, sugiriendo que la ET-1 media, por lo menos en parte, la producción de CTGF inducida por Ang II. Nuestros datos indicando que la ET-1 induce la producción de CTGF incluso a las 72 horas, y que la coincubación de ET-1 y TGF- β tiene un efecto sinérgico en la producción de CTGF, apoyan la idea de que el CTGF contribuye a la perpetuación de la fibrosis. También mostramos un mecanismo diferente en cuanto a las rutas de señalización utilizadas por ambos péptidos vasoactivos, ya que la ET-1 no logró activar la ruta de las Smad en CMLV cultivadas (datos no mostrados) mientras que la Ang II si, algo que discutiremos en el siguiente apartado de esta tesis.

Nuestros resultados muestran que en CMLV ET-1, a través del receptor ET_A aumenta la producción de CTGF y MEC. Los mecanismos de la regulación del CTGF son complejos, implicando la activación de diversas señales intracelulares (procesos redox, activación de la ruta RhoA/quinasa de Rho y MAPK/ERK) la interrelación con otros actores de crecimiento (TGF- β y Ang II). Este reciente descubrimiento sugiere que CTGF podría ser un mediador de los efectos profibróticos de la ET-1 en las enfermedades vasculares y apoya la idea de la utilización de bloqueadores de del CTGF como una nueva terapia para las enfermedades vasculares (Fig 12).

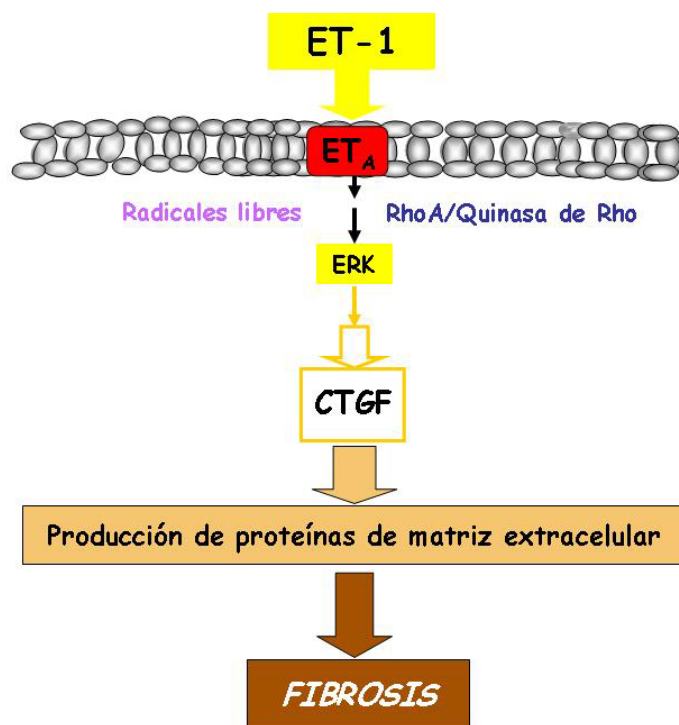


FIGURA 12. Esquema de la regulación de CTGF por ET-1. La ET-1 vía receptor ET_A y a través de la generación de ROS y la activación de RhoA/quinasa de Rho fosforila la ERK para inducir la producción de CTGF que es mediador de la acumulación de MEC causada por ET-1.

2. La Ang II activa la ruta de señalización de las Smad de manera independiente del TGF- β .

La Ang II participa en la patogenia de distintas enfermedades vasculares regulando la presencia de fibrosis e inflamación. El bloqueo de este péptido vasoactivo es uno de los mejores fármacos en el tratamiento de las enfermedades vasculares⁴⁶.

Nuestros resultados muestran que la Ang II activa la vía de señalización de las Smad en células vasculares, tanto *in vivo* como *In Vitro*. También hemos encontrado que las proteínas Smad participan en la expresión del CTGF y producción de MEC inducida por la Ang II. Estos nuevos datos sugieren que la activación de la vía de las Smad puede estar implicada en los efectos profibrogénicos de la Ang II en el daño vascular.

Para evaluar el efecto de la Ang II en la vía de señalización de las Smad *in vivo* se ha utilizado un modelo de infusión sistémica de la Ang II. En este modelo, la Ang II provoca fibrosis vascular, la cual puede estar mediada por el aumento en la expresión del CTGF²⁰³. En la aorta de los animales control, hemos observado una tinción débil de las proteínas Smad que aumentó considerablemente en los animales infundidos con la Ang II y se redujo en aquellos animales tratados con Losartán, indicando que dicha sobreexpresión está mediada por los receptores AT₁. La tinción positiva para p-Smad2 se localizó principalmente en el núcleo de las CMLV. El incremento de la expresión de las proteínas Smad estaba asociada con la inducción del CTGF, precediendo a la acumulación de proteínas de la MEC observada tan sólo después de siete días²⁰³, sugiriendo que esta vía de señalización podría ser un mecanismo implicado en la fibrosis vascular causada por la Ang II.

Para demostrar que la Ang II activa la vía de señalización de las Smad a través de la activación directa de CMLV e independientemente de los cambios hemodinámicos o la hipertensión, hemos hecho experimentos en CMLV en cultivo. En estas células, la Ang II causó un aumento en la expresión de Smad2 y Smad4, la fosforilación de Smad2, la translocación al núcleo de p-Smad2 y Smad4 e incrementó la capacidad de unión al ADN. La activación de Smad inducida por la Ang II es muy rápida (a los 5 minutos, siendo máxima alrededor de los 15 y 20 minutos). Además, hemos demostrado que la Ang II incrementó la transcripción génica dependiente de Smad mediante transfecciones transitorias con un plásmido reportero que contiene sitios de unión del promotor de Smad.

Las proteínas Smad han sido identificadas como transductoras de las señales intracelulares de TGF- β . Las Smad son sustratos de la quinasa del receptor de TGF- β que se translocan al núcleo para actuar como factores de transcripción^{99, 146}. Hay varias proteínas Smad. Smad2 y Smad3 son mediadores específicos de la vía TGF- β /activina, mientras que Smad1, Smad5 y Smad8 están implicadas en la señalización de las proteínas morfogénicas del hueso (BMP)^{99, 146}. Smad4 forma hetero-oligómeros con las Smad activadas por receptor y es un mediador común de la señalización de TGF- β y BMP. A concentraciones fisiológicas, Smad6 puede inhibir selectivamente la señalización del receptor BMP,

mientras que Smad7 inhibe tanto la señalización del receptor BMP como la del receptor TGF- β /activina. En CMLV, hemos demostrado que la Ang II activa Smad2 y Smad4 mostrando un comportamiento similar al observado con el TGF- β . Hemos comparado la respuesta de la Ang II y el TGF- β , observando que ambos factores activan la vía de señalización de las Smad con una cinética similar, sugiriendo una activación directa de las Smad inducida por la Ang II. Se ha descrito que la Ang II regula la expresión de ARNm del TGF- β , la síntesis de proteína y la conversión de TGF- β a su forma activa ²¹. Para demostrar que el efecto de la Ang II era independiente de la producción de TGF- β endógeno o su activación, hemos usado CMLV de ratas Wistar, en las que hemos confirmado que la Ang II no es capaz de activar el TGF- β , tal y como esta descrito ¹⁵⁹, aunque incrementó la producción total del TGF- β . Además, bloqueamos el TGF- β mediante diferentes métodos: con un anticuerpo neutralizante de la forma activa del TGF- β , y con la decorina, que es un secuestrador de su forma activa. El bloqueo del TGF- β endógeno no alteró la translocación al núcleo de p-Smad2, la unión al ADN y la activación del promotor causada por la Ang II. Estos datos claramente indican que el bloqueo del TGF- β no modificó la activación de la vía de señalización de las Smad inducida por la Ang II, demostrando que la señalización de Smad inducida por la Ang II es independiente del TGF- β . Nuestros resultados han sido confirmados recientemente en un estudio realizado en CMLV de ratón en los que observaron que la Ang II era capaz de activar las Smad incluso en células que no expresaban el TRII, indicando que la activación de las Smad era totalmente independiente de TGF- β ²⁴⁹.

La Ang II actúa mediante la unión a receptores específicos ²⁰². El receptor AT₁ es responsable de la mayoría de las acciones patofisiológicas de la Ang II, contribuye al desarrollo de enfermedades crónicas, como la hipertensión, la aterosclerosis, la hipertrofia cardíaca y el daño renal, promoviendo el crecimiento celular, la inflamación y la fibrosis. El AT₂ está implicado en la inhibición del crecimiento celular y en el reclutamiento de células inflamatorias ²⁰². En esta tesis hemos obtenido que el antagonista del receptor AT₁, Losartán, disminuyó la expresión de las Smad en las aortas de las ratas infundidas con la Ang II y en CMLV en cultivo y bloqueó la activación de la ruta de señalización de las Smad inducida por la Ang II (fosforilación de Smad2, translocación al núcleo y unión al ADN). Nuestros datos demuestran claramente que la Ang II activa la vía de señalización de las Smad a través del receptor AT₁. La Ang II vía AT₁ regula la expresión de factores profibróticos (incluido CTGF) y proteínas de la MEC ^{167, 202}. Nuestros resultados demuestran que la activación de la vía de señalización de las Smad a través de los receptores AT₁ podría ser un nuevo mecanismo implicado en la fibrosis vascular inducida por la Ang II.

La activación de la vía de señalización de las Smad causa su translocación nuclear. En el núcleo, las Smad interactúan con factores de transcripción en los promotores de algunos genes, regulando su transcripción. En CMLV, hemos observado que la Ang II activa el promotor dependiente de Smad sugiriendo un aumento en la transcripción génica mediada por Smad. Estudios previos han demostrado que el TGF- β , vía activación Smad, regula la transcripción de varios genes importantes para la regulación del ciclo celular, los cuales median la respuesta antiproliferativa y parcialmente explican la

acción supresora de tumores del TGF- β ¹⁶⁰, así como genes para la formación de la MEC, como el procolágeno, la FN y el PAI-1 ^{33, 41, 95}. El incremento en la expresión de algunas proteínas Smad activa la transcripción de algunos de estos genes, como PAI-1, incluso en ausencia del TGF- β ^{146, 241}. En el promotor del CTGF hay un sitio de unión a Smad⁹⁰. En células mesangiales, el TGF- β activa el CTGF vía Smad ⁹⁰. El CTGF es un importante factor profibrótico ¹⁸¹ y es un mediador de la fibrosis vascular inducida por la Ang II ²⁰³. En las CMLV, la Ang II incrementó la expresión del ARNm del CTGF, actividad del promotor y producción de proteína. La proteína Smad7 puede funcionar como un regulador negativo de la señalización a través las proteínas Smad¹⁶⁷. Transfecciones transitorias con Smad7 (el cual interfiere con la activación de Smad2 y Smad3 mediada por receptor), disminuyó la activación del promotor del CTGF inducida por la Ang II, la expresión del ARNm y la producción de proteína. Varios trabajos han demostrado que el aumento en la expresión de Smad7 bloquea la producción de la MEC inducida por TGF- β en células renales ^{32, 84, 114, 124}. En CMLV hemos observado que la sobre-expresión de Smad7 redujo la sobre-expresión de la FN y el procolágeno tipo I causada por la Ang II. Nuestros resultados indican que la vía de señalización de las Smad está implicada en la expresión del CTGF y las proteínas de la MEC, y podría contribuir a los efectos profibrogénicos de la Ang II en enfermedades vasculares.

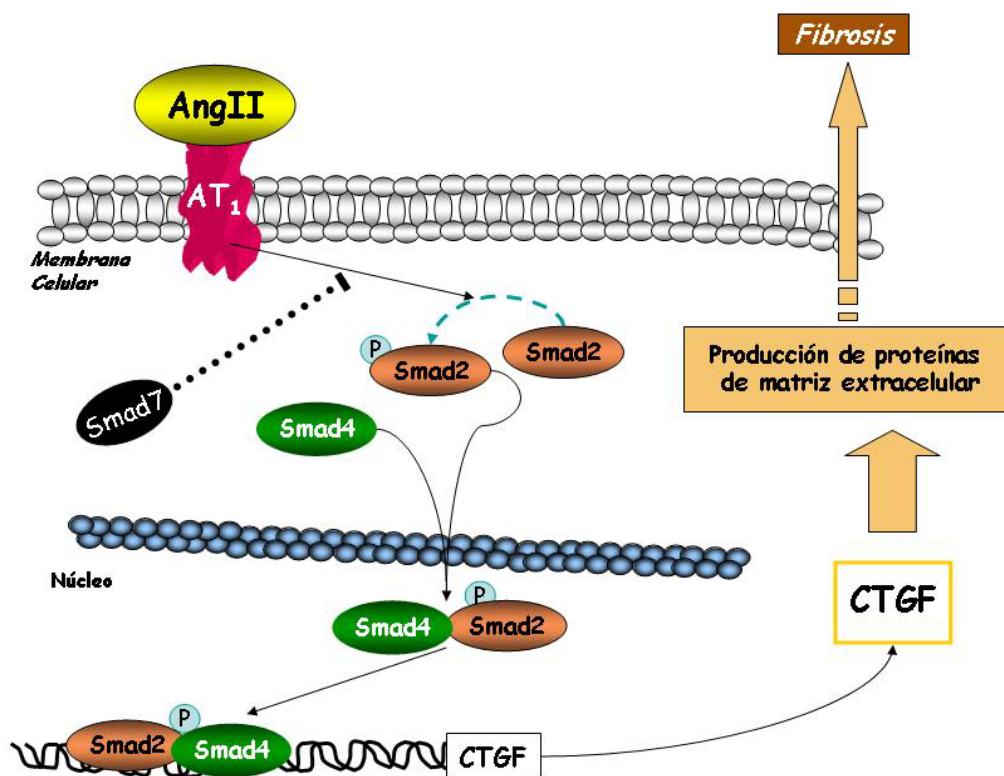


FIGURA 13. Esquema de la regulación de CTGF por Ang II a través de las Smad. La Ang II vía receptor AT₁ fosforila Smad2 que al unirse a Smad4 se transloca al núcleo para regular la transcripción de CTGF que es mediador de la acumulación de MEC dependiente de Ang II para producir fibrosis.

Se han descrito otros factores implicados en el daño tisular que activan la ruta de las Smad. En células transfectadas para expresar el TRII, la proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-3), estimuló la fosforilación de Smad2 y Smad3, potenció la fosforilación de Smad

estimulada por TGF- β 1, y cooperó con el TGF- β 1 exógeno en la inhibición del crecimiento celular⁵³. En células PC12, el factor de crecimiento nervioso permite la activación de la ruta de las Smad independientemente del TGF- β ¹³⁵. Los productos finales glicosilados causaron una rápida activación Smad2/Smad3 en células renales y vasculares de manera independiente del TGF- β ¹²³ sugiriendo la importancia de la vía de las Smad en el daño tisular en la diabetes. Nuestro estudio ha demostrado que la Ang II activa la vía de señalización de las Smad en células vasculares, independientemente de TGF- β . Estos datos proporcionan una gran evidencia de que las proteínas Smad no son exclusivamente activadas por el mecanismo clásico de TGF- β .

En conclusión, nuestros datos demuestran que la Ang II activa la ruta de señalización de las proteínas Smad en las CMLV, independientemente del TGF- β . En las ratas infundidas con la Ang II, la sobre-expresión aórtica de las Smad está asociada con la inducción del CTGF y precede a la sobre-expresión de proteínas de la MEC, sugiriendo que las proteínas Smad podrían estar implicadas en los cambios estructurales de la pared vascular. Estos datos podrían contribuir al conocimiento de los mecanismos relacionados con la fibrosis en las enfermedades cardiovasculares (Fig 13).

3. El TGF- β es un mediador de las Acciones de las estatinas sobre las CMLV.

En esta tesis hemos descrito una interrelación entre las acciones de las estatinas y del TGF- β en diferentes aspectos del proceso aterosclerótico. Hemos descrito por primera vez que en CMLV las estatinas potencian la activación de la ruta de las Smad por TGF- β . Además, las estatinas también aumentan la expresión del receptor TRII y la síntesis de TGF- β en CMLV, lo que conduce a un aumento de las acciones dependientes de TGF- β . En este sentido, las estatinas aumentan la susceptibilidad de las CMLV a la apoptosis inducida por TGF- β , y aumentan la sobrerregulación de la MEC.

La ruta de las Smad es la principal ruta de señalización empleada por el TGF- β . Hemos observado que dos estatinas Sinvastatina (SV) y Atorvastatina (ATV) aumentaron la activación de la ruta de las Smad causada por el TGF- β . En CMLV las estatinas potenciaron la fosforilación de Smad2 y Smad3 y la transcripción dependiente de Smad. El TGF- β a través de la ruta de las Smad regula muchas respuestas intracelulares, como el crecimiento celular, la diferenciación celular, la acumulación de MEC¹⁴⁸. Estos procesos son sujeto de la regulación de otras rutas de señalización como las MAPK¹⁴⁸. Muchos estudios han demostrado que las estatinas inhiben rutas intracelulares muy diferentes, incluyendo la activación de factores de transcripción, como el NF- κ B, proteínas G pequeñas y la activación de proteínas quinasas, como MAPK y ROCK¹²⁷(Hypertension, en prensa). Las estatinas, a través de la inhibición de estas rutas, regula respuestas celulares, mostrando propiedades antiinflamatorias que pueden ser responsables de los efectos beneficiosos en el tratamiento de la aterosclerosis¹²⁷. nuestros resultados muestran que las estatinas potencian la ruta TGF- β /Smad. Las

proteínas Smad son factores nucleares que dependen del contexto celular para producir sus respuestas¹⁴⁸. Dado que las estatinas tienen un efecto protector en la aterosclerosis nuestros datos indican que las estatinas preparan el contexto celular para favorecer el que las proteínas Smad provoquen un efecto protector.

Se ha descrito una expresión diferencial de los receptores de TGF- β en las CMLV presentes en vasos normales con respecto a las de lesiones ateroscleróticas^{94, 151}. Así, las CMLV provenientes de placas ateroscleróticas casi no expresan el receptor TRII en comparación con las de vasos normales en donde el TRII es el más abundante. Esto indica un cambio fenotípico en las CMLV durante la aterosclerosis¹⁵¹⁻¹⁵³. Nosotros hemos observado que en las CMLV en cultivo, provenientes de aortas de rata sanas, las estatinas aumentan la expresión del TRII, indicando que las estatinas pueden inducir una reversión del fenotipo de las CMLV, provocando un cambio de un fenotipo “aterosclerótico” a un fenotipo “normal”. Este hecho podría ser una explicación de los efectos beneficiosos que se observan en el tratamiento de la aterosclerosis con estatinas.

Nuestros resultados demuestran que en CMLV las estatinas aumentan la síntesis de TGF- β . Esta producción local de TGF- β podría participar en los efectos beneficiosos de las estatinas. En la aterosclerosis el TGF- β se ha considerado como una “citoquina protectora”, ya que tiene una función muy importante en el mantenimiento de la estructura normal de la pared del vaso y controla el equilibrio entre la inflamación y la acumulación de MEC¹³⁴. La pérdida de este efecto protector, atribuido a cambios en los perfiles de los receptores de TGF- β y en la modulación de los niveles locales de TGF- β , contribuye al desarrollo de la aterosclerosis. Los estudios realizados por Graiger y colaboradores apoyan esta hipótesis. En modelos experimentales la ausencia de la señalización del TGF- β promueve el desarrollo de lesiones ateroscleróticas y placas inestables^{134, 141, 188}. En placas carótideas humanas, se ha encontrado una expresión mayor de TGF- β en lesiones asintomáticas comparadas con las placas sintomáticas. El TGF- β se expresaba principalmente en los hombros de las placas y asociado con un aumento comparable en el contenido de procolágeno y colágeno³⁴; lo que proporciona evidencias de que el TGF- β puede desarrollar una función importante en el proceso de estabilización de la placa favoreciendo una mejor prognosis.

La acción celular de las estatinas puede explicarse por la inhibición de la isoprenilación de varias proteínas, incluyendo las proteínas G pequeñas¹²⁷. En las CMLV, hemos obtenido que la preincubación con L-mevalonato y GGPP disminuyó la activación de las Smad inducida por las estatinas y la sobreexpresión de TRII y TGF- β , lo que indica la implicación de una proteína geranilgeranilada en estos procesos. Asimismo, estos resultados se reprodujeron de manera similar usando inhibidores de la ruta RhoA/ROCK (usando el exoenzima C3 o inhibiendo la ROCK mediante Y-27632), indicando que los efectos de las estatinas se pueden ser debidos a la inhibición de RhoA/ROCK.

La aterosclerosis es un proceso muy complicado que comprende disfunción endotelial, inflamación, alteraciones de la MEC y formación de neointima. Las estatinas han demostrado tener unos efectos clínicos muy beneficiosos que incluyen mejora de la disfunción endotelial, disminución de la

inflamación y aumento en la estabilidad de la placa^{49,126}. Uno de los pasos clave, y probablemente implicado en el origen de la aterosclerosis es la proliferación de las CMLV. Estrategias terapéuticas recientes se han centrado en la inhibición de la proliferación de las CMLV⁴⁵. Hay una discusión controvertida sobre la conveniencia de la apoptosis de las CMLV. Algunos autores han descrito que aquellas terapias que aumentan la apoptosis de las CMLV son buenos en el tratamiento de la aterosclerosis⁴⁵, sin embargo un estudio reciente ha demostrado que la apoptosis por si sola no es beneficiosa para la regresión de la aterosclerosis^{35, 36}. En estos estudios experimentales se muestra que la apoptosis aumenta la inestabilidad de la placa induciendo la ruptura de la misma³⁵. En este campo tan controvertido también se ha demostrado que las estatinas inducen la apoptosis de las CMLV^{19, 74} y como es bien conocido tienen un resultado beneficioso en el tratamiento de la aterosclerosis. En esta tesis hemos observado que en CMLV la coincubación de TGF- β y tanto SV como ATV durante 48 horas en condiciones libres de suero causó un aumento drástico de la apoptosis en comparación con cada estímulo por separado, vía inhibición de la RhoA, sugiriendo que en situaciones de detención del crecimiento celular las estatinas aumentan la susceptibilidad de las CMLV a la apoptosis inducida por TGF- β .

También hemos obtenido que en presencia de un 10% de suero de ternera fetal (STF) la apoptosis de las CMLV inducida por las estatinas está mediada por la ruta TGF- β /Smad. Los experimentos con suero libre de TGF- β y bloqueando la acción de TGF- β con un inhibidor de la activación vía receptor ALK5, isoforma del TRI mayoritaria en las CMLV, demuestran que el TGF- β presente en el suero es el responsable de la muerte celular inducida por las estatinas. El bloqueo de la activación de las Smad mediante la sobreexpresión de Smad7 disminuyó la apoptosis inducida tanto por estatinas en presencia de suero, sugiriendo la implicación de la ruta de las Smad.

La sobreexpresión de Smad7 también inhibió la apoptosis inducida por la expresión del dominante negativo de RhoA. Estos datos indican que tanto las estatinas como la inhibición de RhoA inducen la muerte celular mediante la acción de TGF- β a través de la ruta de las Smad. Este es un dato importante ya que había un gran interés por saber cual era el mecanismo por el que las estatinas producían la apoptosis de las CMLV⁵¹. Resultaba sorprendente que se produjese principalmente en presencia de STF, y se argumentaba que era porque las células se encontraban proliferando lo cual las hacía más vulnerables a las estatinas. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la diferencia entre ambas situaciones, 10% de STF o medio libre de STF, es únicamente la presencia o no de TGF- β .

Se ha descrito que el TGF- β es un importante factor de estabilización y evita la ruptura de la placa de ateroma mediante la disminución en la producción de las metaloproteasas de la matriz, como se ha visto en placas ateroscleróticas humanas²². En esta tesis demostramos que las estatinas aumentan la acumulación de MEC inducida por TGF- β , como muestran la sobreexpresión del mediador profibrótico CTGF, y del inhibidor de la degradación de MEC PAI-1. Estos resultados se podrían deber a un aumento del receptor TRII y de la ruta de TGF- β /Smad, ya que las Smad se ha atribuido a la regulan estas proteínas de la MEC^{38, 117}.

Se ha descrito que CTGF induce apoptosis de CMLV ⁸⁸, por lo que decidimos analizar si en la apoptosis observada en el tratamiento con estatinas, podría tener alguna implicación la sobreexpresión de CTGF. El bloqueo del CTGF endógeno con un oligonucleótido antisentido reveló que la producción de CTGF es necesaria para la inducción de la apoptosis dependiente de TGF- β y estatinas.

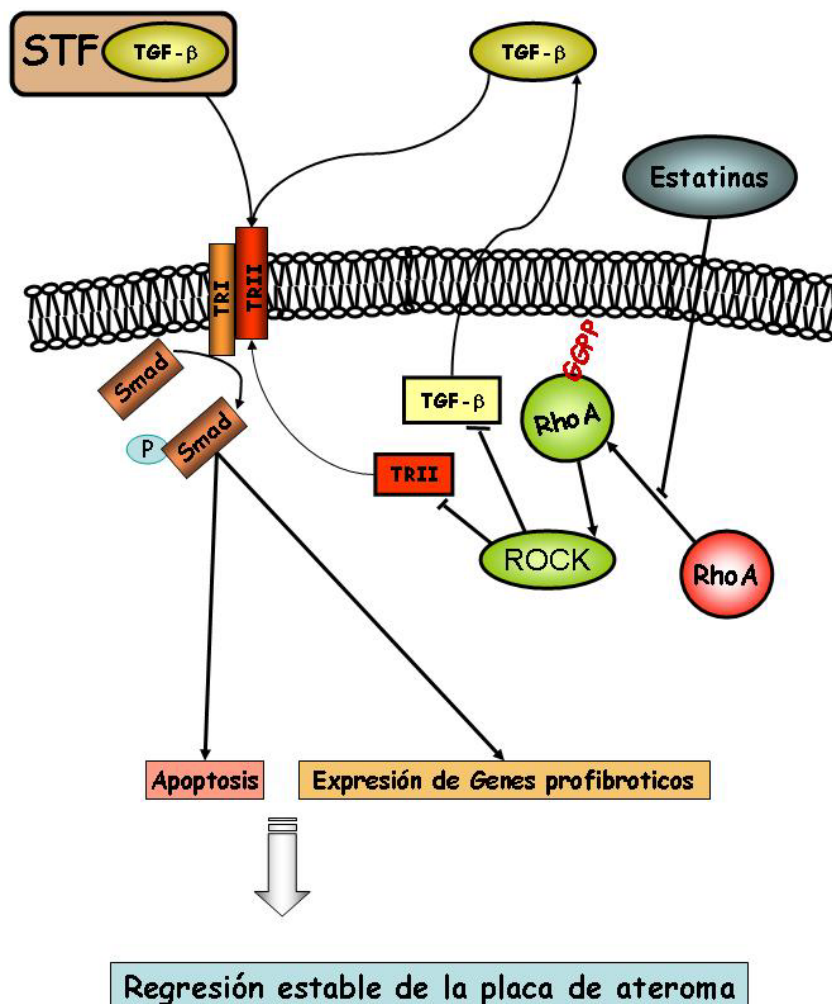


FIGURA 14. Modelo de acción de las estatinas en la ruta del TGF- β .

Se ha descrito en la literatura que las estatinas son uno de los mejores tratamientos para la aterosclerosis^{49, 170, 171}. En esta tesis mostramos por primera vez que uno de los principales mediadores de sus acciones es el TGF- β , lo que aporta algo más de luz a los mecanismos utilizados por las estatinas. Hasta ahora se había estado hablando de los efectos pleiotrópicos de las estatinas principalmente relacionados con la inhibición de la isoprenilación. Sin embargo, no explicaba todos los efectos obtenidos por el tratamiento con estatinas. En esta tesis los efectos pleiotrópicos ofrecen un aspecto nuevo. Nuestros resultados demuestran que esos efectos están mediados por el TGF- β a través de su principal ruta de señalización, las proteínas Smad. Esta ruta es la única no sólo no inhibida sino incluso potenciada por las estatinas. Nuestros datos muestran que el tratamiento con estatinas inhibe las proteínas G pequeñas, entre ellas la ruta RhoA/ROCK, pero potencia la ruta de las Smad dirigiendo las repuestas al TGF- β a través de este mecanismo de señalización. Estos resultados nos llevan a plantear una hipótesis

sobre los mecanismos de acción de las estatinas en la aterosclerosis, donde la ruta del TGF- β /Smad desempeña una función clave, como se muestra en la figura 14. Las estatinas inhiben la prenilación de RhoA lo que impide que dicha proteína, a través de la activación de la ROCK, inhiba la producción de TGF- β y TRII. Esto se traduce en un aumento de la presencia de TGF- β y de su receptor, lo que provoca un incremento en la señalización a través de la ruta Smad. Las estatinas a través de este mecanismo, aumentan la apoptosis de las CMLV, y a su vez inducen una mayor acumulación de proteínas de la MEC. Estos procesos contribuyen a la estabilización de la placa de ateroma, al aumentar el componente fibroso e inducir una apoptosis más controlada. Nuestros datos, junto con los efectos antiinflamatorios descritos sobre las estatinas¹²⁷, permiten tener una visión más completa de las acciones de las estatinas en el proceso aterosclerótico.

4. La regulación del CTGF es un evento clave en el desarrollo de la fibrosis vascular

En esta tesis hemos explorado las funciones y mecanismos moleculares de varios de los factores más importantes en la progresión del daño vascular, la ET-1, la Ang II y el TGF- β . Hemos comprobado que el mecanismo por el que un daño vascular se desarrolla es extremadamente complejo. Esta complicación se refleja en la regulación de una proteína, el CTGF. Dicha regulación está mediada por diversas rutas de señalización. Muchas de estas rutas están compartidas por los tres factores que se han estudiado, como son las MAPK, los radicales de oxígeno o la RhoA (Fig. 15), mientras que la ruta de las Smad sólo la utilizarían la Ang II y el TGF- β . Además, también hemos comprobado que la progresión del daño vascular es asimismo sumamente compleja, y que dicha complejidad se plasma precisamente en el CTGF. Esta proteína dependiendo de las condiciones en las que se exprese así como del factor que la induzca, tiene efectos tanto en la progresión del daño como en su mejora. En esta tesis hemos confirmado que es un factor mediador de la fibrosis, lo que indica que tiene un efecto esencialmente dañino. Sin embargo, esta proteína se induce fuertemente por las estatinas, lo que sugiere que en algunas condiciones concretas podría tener un efecto beneficioso. Este sería el caso de la aterosclerosis, dado que un elemento fundamental es la estabilidad de la placa de ateroma, el hecho de que se sobreexpresen este mediador fibrótico aumenta dicha estabilidad. Además también hemos demostrado que el CTGF es mediador de la apoptosis inducida por TGF- β y estatinas, algo que en la aterosclerosis, en la que hay una proliferación descontrolada de las CMLV, podría tener un efecto positivo. Teniendo en cuenta que todos estos efectos en otros contextos como la hipertensión no serían beneficiosos esta proteína se convierte en un factor clave en las enfermedades cardiovasculares y su regulación es una de las dianas terapéuticas más prometedoras.

Otro de los factores clave en las enfermedades cardiovasculares es el TGF- β . Este factor no sólo es el mediador de algunas de las acciones de la Ang II y la ET-1²⁰¹, sino que también regula la práctica

totalidad de los procesos relacionados con las enfermedades cardiovasculares como la fibrosis o la inflamación. En muchos casos es la desregulación de sus respuestas la que desarrolla el daño vascular. Estas desregulaciones pueden darse por la acción indirecta de factores implicados en el daño como podría ser la ET-1 a través de la inducción de la Trombospondina-1²⁵⁶, una de las activadoras conocidas del TGF- β ¹⁶¹. También pueden ser de carácter directo como la acción de la Ang II que es capaz de inducir su expresión y activación; y que como hemos demostrado en esta tesis comparte mucha de su señalización intracelular. Y por último podría ser dependiente de una confluencia de factores como los que inician el proceso aterosclerótico, y que producen un cambio en el fenotipo de las CMLV, haciendo que el ratio entre los receptores del TGF- β , TRII/TRI, disminuya de tal forma que el TRII apenas se exprese, conduciendo a una alteración de las respuestas inducidas por el TGF- β . Todo esto provoca que la regulación de un factor tan importante como es el TGF- β se vea alterada de tal forma que ayuda a la progresión del daño.

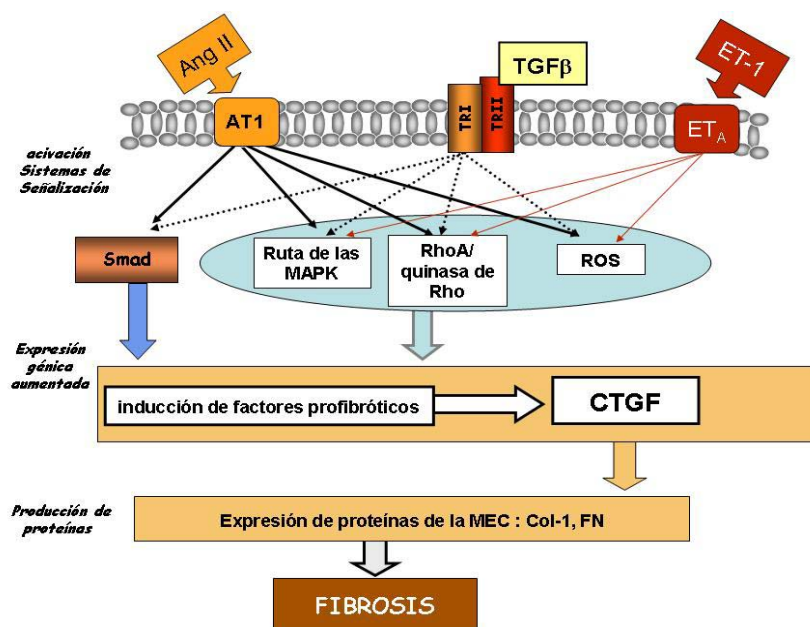


FIGURA 15. Rutas de señalización en la regulación del CTGF

Cabe resaltar también la importancia de las CMLV en los procesos de daño vascular, y como su estudio directo mediante aproximaciones *In Vitro* de situaciones observadas durante la lesión vascular nos puede dar mucha información para el tratamiento de dichas enfermedades en el futuro. Estas células están implicadas en la inflamación por la expresión de numerosos mediadores inflamatorios como el MCP-1, IL-6 y moléculas de adhesión como ICAM, VCAM⁴⁵. Sin embargo la mayor contribución estas células al daño vascular es la producción de proteínas de la MEC. En esta tesis hemos definido mejor los mecanismos por los que las CMLV producen MEC así como las principales rutas de señalización implicadas. De entre estas rutas de señalización cabe destacar la ruta RhoA/ROCK ya que es una de las rutas compartidas por los tres factores sujetos del estudio en esta tesis. Además esta ruta es una de las que inhibe el tratamiento con estatinas lo que lleva a una mejora del daño vascular indicando que este mecanismo es uno de los principales responsables de dicho daño.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En CMLV en cultivo la ET-1 incrementa la producción de CTGF y fibronectina, a través del receptor ET_A y de la activación de diversas señales intracelulares (mecanismos redox y activación de RhoA).
2. El bloqueo de la producción endógena de CTGF mediante un oligonucleótido antisentido inhibió la fibrosis inducida por ET-1, lo que sugiere que este factor podría ser un mediador de los efectos profibróticos de ET-1 en las enfermedades vasculares.
3. La ET-1 es un intermediario de la inducción de CTGF por Ang II, mientras que la inducción de CTGF por ET-1 es independiente de TGF- β .
4. La AngII activa la ruta de señalización de las proteínas Smad en las CMLV por un mecanismo independiente del TGF- β y a través del receptor AT₁.
5. El bloque de la activación de la ruta de las proteínas Smad mediante la sobreexpresión de Smad7 inhibió tanto la producción de CTGF, Col1 y FN inducida por Ang II y TGF- β , lo que sugiere que esta ruta de señalización podría estar implicada en los cambios estructurales de la pared vascular. Estos datos contribuyen al conocimiento de los mecanismos relacionados con la fibrosis en las enfermedades cardiovasculares.
6. Las estatinas ejercen un efecto directo sobre la ruta TGF- β /Smad, lo cual podría explicar, al menos en parte, los efectos pleiotrópicos relacionados con los mecanismos de actuación de estos fármacos.

El CTGF es un mediador de las respuestas inducidas por la ET-1, la Ang II y el TGF- β en las CMLV. Esta citoquina profibrotica es una de las claves para entender los cambios producidos por estos mediadores en las enfermedades vasculares. La modulación de las acciones del CTGF podría ayudar a desarrollar nuevos abordajes más efectivos en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet* 2001 September 29;358(9287):1033-41.
- (2) Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA* 2002 December 18;288(23):2981-97.
- (3) Akishita M, Ouchi Y, Miyoshi H et al. Estrogen inhibits endothelin-1 production and c-fos gene expression in rat aorta. *Atherosclerosis* 1996 August 23;125(1):27-38.
- (4) Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, Winkles JA. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem* 1994 April 1;269(13):10112-8.
- (5) Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 1995 February;25(2):155-61.
- (6) Alvarez A, Cerda-Nicolas M, Naim Abu NY et al. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* 2004 July 15;104(2):402-8.
- (7) Ammarguella FZ, Gannon PO, Amiri F, Schiffrin EL. Fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET(A) receptors. *Hypertension* 2002 February;39(2 Pt 2):679-84.
- (8) Andersen S, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Parving HH. Angiotensin II blockade is associated with decreased plasma leukocyte adhesion molecule levels in diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2000 July;23(7):1031-2.
- (9) Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 2003 January 15;116(Pt 2):217-24.
- (10) Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990 December 20;348(6303):730-2.
- (11) Bacon CR, Cary NR, Davenport AP. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta. *Circ Res* 1996 October;79(4):794-801.
- (12) Barton M, Carmona R, Morawietz H et al. Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin-converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. *Hypertension* 2000 January;35(1 Pt 2):329-36.
- (13) Barton M, Cosentino F, Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Luscher TF. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension* 1997 October;30(4):817-24.
- (14) Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 November 24;95(24):14367-72.

- (15) Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 September 29;238(3):861-5.
- (16) Benatti L, Fabbrini MS, Patrono C. Regulation of endothelin-1 biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* 1994 April 18;714:109-21.
- (17) Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 2001 July;81(3):999-1030.
- (18) Best PJ, McKenna CJ, Hasdai D, Holmes DR, Jr., Lerman A. Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation* 1999 April 6;99(13):1747-52.
- (19) Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M et al. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 2002 March;161(1):17-26.
- (20) Bodin P, Milner P, Marshall J, Burnstock G. Cytokines suppress the shear stress-stimulated release of vasoactive peptides from human endothelial cells. *Peptides* 1995;16(8):1433-8.
- (21) Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 1998 January;31(1 Pt 2):181-8.
- (22) Borrelli V, di ML, Sapienza P, Colasanti M, Moroni E, Cavallaro A. Role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta1 the in the regulation of metalloproteinase expressions. *Surgery* 2006 September;140(3):454-63.
- (23) Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990 February;85(2):587-90.
- (24) Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992 June;70(6):1191-7.
- (25) Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation* 1998 July 7;98(1):82-9.
- (26) Brewster UC, Setaro JF, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and cardiovascular disease states. *Am J Med Sci* 2003 July;326(1):15-24.
- (27) Callera GE, Touyz RM, Teixeira SA et al. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. *Hypertension* 2003 October;42(4):811-7.
- (28) Cambien F, Poirier O, Lecerf L et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992 October 15;359(6396):641-4.
- (29) Campbell JH, Han CL, Campbell GR. Neointimal formation by circulating bone marrow cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001 December;947:18-24.

- (30) Castanares C, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, ten DP, Lamas S, Rodriguez-Pascual F. Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation. *J Cell Sci* 2007 April 1;120(Pt 7):1256-66.
- (31) Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF-beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 2000 October;32(10):1805-19.
- (32) Chen R, Huang C, Morinelli TA, Trojanowska M, Paul RV. Blockade of the effects of TGF-beta1 on mesangial cells by overexpression of Smad7. *J Am Soc Nephrol* 2002 April;13(4):887-93.
- (33) Chen SJ, Yuan W, Lo S, Trojanowska M, Varga J. Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human alpha2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF-beta. *J Cell Physiol* 2000 June;183(3):381-92.
- (34) Cipollone F, Fazia M, Mincione G et al. Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke* 2004 October;35(10):2253-7.
- (35) Clarke M, Bennett M. Defining the role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis. *Cell Cycle* 2006 October;5(20):2329-31.
- (36) Clarke MC, Figg N, Maguire JJ et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* 2006 September;12(9):1075-80.
- (37) Corder R, Carrier M, Khan N, Klemm P, Vane JR. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 Suppl 3:S56-S58.
- (38) Datta PK, Blake MC, Moses HL. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor-beta -induced physical and functional interactions between smads and Sp1. *J Biol Chem* 2000 December 22;275(51):40014-9.
- (39) de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000 September;52(3):415-72.
- (40) Denault JB, Claing A, Orleans-Juste P et al. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett* 1995 April 10;362(3):276-80.
- (41) Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten DP, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 1998 June 1;17(11):3091-100.
- (42) DeRuiter MC, Poelmann RE, VanMunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, Gittenberger-de Groot AC. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ Res* 1997 April;80(4):444-51.
- (43) Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH. Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 1992 January 15;267(2):1279-85.
- (44) Duncan MR, Frazier KS, Abramson S et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 1999 October;13(13):1774-86.

- (45) Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002 November;8(11):1249-56.
- (46) Egido J, Ruiz-Ortega M. Anti-inflammatory Actions of Quinapril. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007 April 3.
- (47) Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F. Endothelin-1 as an autocrine growth factor for endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 Suppl 3:S279-S283.
- (48) Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH et al. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med* 1990 December 1;172(6):1741-8.
- (49) Ehrenstein MR, Jury EC, Mauri C. Statins for atherosclerosis--as good as it gets? *N Engl J Med* 2005 January 6;352(1):73-5.
- (50) Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 1995 June 23;270(25):15262-8.
- (51) Erl W. Statin-induced vascular smooth muscle cell apoptosis: a possible role in the prevention of restenosis? *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005 April;5(2):135-44.
- (52) Fan WH, Pech M, Karnovsky MJ. Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration in vitro. *Eur J Cell Biol* 2000 December;79(12):915-23.
- (53) Fanayan S, Firth SM, Butt AJ, Baxter RC. Growth inhibition by insulin-like growth factor-binding protein-3 in T47D breast cancer cells requires transforming growth factor-beta (TGF-beta) and the type II TGF-beta receptor. *J Biol Chem* 2000 December 15;275(50):39146-51.
- (54) Fei J, Viedt C, Soto U, Elsing C, Jahn L, Kreuzer J. Endothelin-1 and smooth muscle cells: induction of jun amino-terminal kinase through an oxygen radical-sensitive mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 May;20(5):1244-9.
- (55) Ferri C, Pittoni V, Piccoli A et al. Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulating levels in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 March;80(3):829-35.
- (56) Finckenberg P, Lassila M, Inkinen K et al. Cyclosporine induces myocardial connective tissue growth factor in spontaneously hypertensive rats on high-sodium diet. *Transplantation* 2001 April 15;71(7):951-8.
- (57) Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996 September;107(3):404-11.
- (58) Fujisaki H, Ito H, Hirata Y et al. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest* 1995 August;96(2):1059-65.
- (59) Fukuchi M, Giaid A. Expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 mRNAs and proteins in failing human hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31 Suppl 1:S421-S423.

- (60) Fukunaga M, Fujiwara Y, Ochi S et al. Stimulatory effect of thrombin on endothelin-1 production in isolated glomeruli and cultured mesangial cells of rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17 Suppl 7:S411-S413.
- (61) Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 1994 October;90(4):2126-46.
- (62) Gasic S, Wagner OF, Fasching P et al. Fosinopril decreases levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in borderline hypertensive type II diabetic patients with microalbuminuria. *Am J Hypertens* 1999 February;12(2 Pt 1):217-22.
- (63) gerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 February;20(2):484-92.
- (64) Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992 August;90(2):456-61.
- (65) Gilbert RE, Rumble JR, Cao Z et al. Endothelin receptor antagonism ameliorates mast cell infiltration, vascular hypertrophy, and epidermal growth factor expression in experimental diabetes. *Circ Res* 2000 February 4;86(2):158-65.
- (66) Gillespie MN, Owasoyo JO, McMurtry IF, O'Brien RF. Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1986 February;236(2):339-43.
- (67) Gomez-Garre D, Ruiz-Ortega M, Ortego M et al. Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension* 1996 April;27(4):885-92.
- (68) Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 June;87(12):4600-4.
- (69) Graham H, Peng C. Activin receptor-like kinases: structure, function and clinical implications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006 March;6(1):45-58.
- (70) Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 March;24(3):399-404.
- (71) Gross CM, Gerbaulet S, Quensel C et al. Angiotensin II type 1 receptor expression in human coronary arteries with variable degrees of atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 2002 July;97(4):327-33.
- (72) Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993 December;27(12):2130-4.
- (73) Guba M, Steinbauer M, Buchner M et al. Differential effects of short-term ace- and AT1-receptor inhibition on postischemic injury and leukocyte adherence in vivo and in vitro. *Shock* 2000 March;13(3):190-6.
- (74) Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 1998 September 7;83(5):490-500.

- (75) Hahn AW, Regenass S, Kern F, Buhler FR, Resink TJ. Expression of soluble and insoluble fibronectin in rat aorta: effects of angiotensin II and endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 April 15;192(1):189-97.
- (76) Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1990 August;1(9):649-59.
- (77) Haller H, Schaberg T, Lindschau C, Lode H, Distler A. Endothelin increases $[Ca^{2+}]_i$, protein phosphorylation, and O_2^- production in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1991 December;261(6 Pt 1):L478-L484.
- (78) Hao J, Wang B, Jones SC, Jassal DS, Dixon IM. Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 December;279(6):H3020-H3030.
- (79) Hasdai D, Holmes DR, Jr., Garratt KN, Edwards WD, Lerman A. Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. *Circulation* 1997 January 21;95(2):357-62.
- (80) Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T et al. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* 1998 May 29;428(3):304-8.
- (81) Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* 1995 August 1;92(3):357-63.
- (82) Hendricks-Munoz KD, Gerrets RP, Higgins RD, Munoz JL, Caines VV. Cocaine-stimulated endothelin-1 release is decreased by angiotensin-converting enzyme inhibitors in cultured endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1996 January;31(1):117-23.
- (83) Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985 May;248(5 Pt 1):C550-C556.
- (84) Hill-Kapturczak N, Truong L, Thamilselvan V, Visner GA, Nick HS, Agarwal A. Smad7-dependent regulation of heme oxygenase-1 by transforming growth factor-beta in human renal epithelial cells. *J Biol Chem* 2000 December 29;275(52):40904-9.
- (85) Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest* 2001 June;107(11):1411-22.
- (86) Hirata Y, Kanno K, Watanabe TX et al. Receptor binding and vasoconstrictor activity of big endothelin. *Eur J Pharmacol* 1990 February 6;176(2):225-8.
- (87) Hishikawa K, Oemar BS, Nakaki T. Static pressure regulates connective tissue growth factor expression in human mesangial cells. *J Biol Chem* 2001 May 18;276(20):16797-803.
- (88) Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakaki T, Fujii T, Luscher TF. Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1999 November 16;100(20):2108-12.
- (89) Hlubocka Z, Umnerova V, Heller S et al. Circulating intercellular cell adhesion molecule-1, endothelin-1 and von Willebrand factor-markers of endothelial dysfunction in uncomplicated essential hypertension: the effect of treatment with ACE inhibitors. *J Hum Hypertens* 2002 August;16(8):557-62.

- (90) Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001 April 6;276(14):10594-601.
- (91) Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992 June;19(6 Pt 2):753-7.
- (92) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 April;86(8):2863-7.
- (93) Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 1989 September 5;264(25):14954-9.
- (94) Ishigami M, Swertfeger DK, Hui MS, Granholm NA, Hui DY. Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 April;20(4):1020-6.
- (95) Isono M, Chen S, Hong SW, Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN. Smad pathway is activated in the diabetic mouse kidney and Smad3 mediates TGF-beta-induced fibronectin in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 September 6;296(5):1356-65.
- (96) Ito H, Hirata Y, Adachi S et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1993 July;92(1):398-403.
- (97) Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, Kon V. Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 1995 March 24;270(12):6997-7003.
- (98) Jahan H, Kobayashi S, Nishimura J, Kanaide H. Endothelin-1 and angiotensin II act as progression but not competence growth factors in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1996 January 11;295(2-3):261-9.
- (99) Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 July;36(7):1161-5.
- (100) Jilma B, Li-Saw-Hee FL, Wagner OF, Beevers DG, Lip GY. Effects of enalapril and losartan on circulating adhesion molecules and monocyte chemotactic protein-1. *Clin Sci (Lond)* 2002 August;103(2):131-6.
- (101) Jougasaki M, Schirger JA, Simari RD, Burnett JC, Jr. Autocrine role for the endothelin-B receptor in the secretion of adrenomedullin. *Hypertension* 1998 November;32(5):917-22.
- (102) Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993 September 5;268(25):19126-33.
- (103) Kataoka C, Egashira K, Inoue S et al. Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension* 2002 February;39(2):245-50.

- (104) Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 2006 May;118(1):10-24.
- (105) Kishi F, Minami K, Okishima N et al. Novel 31-amino-acid-length endothelins cause constriction of vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 July 20;248(2):387-90.
- (106) Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z, Bdolah A. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* 1988 October 14;242(4876):268-70.
- (107) Knofler R, Urano T, Malyszko J, Takada Y, Takada A. In vitro effect of endothelin-1 on collagen, and ADP-induced aggregation in human whole blood and platelet rich plasma. *Thromb Res* 1995 January 1;77(1):69-78.
- (108) Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S et al. Down-regulation of ET(B) receptor, but not ET(A) receptor, in congestive lung secondary to heart failure. Are marked increases in circulating endothelin-1 partly attributable to decreases in lung ET(B) receptor-mediated clearance of endothelin-1? *Life Sci* 1998;62(2):185-93.
- (109) Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1988 October 10;238(2):249-52.
- (110) Kowala MC, Rose PM, Stein PD et al. Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. *Am J Pathol* 1995 April;146(4):819-26.
- (111) Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994 April 21;368(6473):703-10.
- (112) Lahav R, Heffner G, Patterson PH. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 September 28;96(20):11496-500.
- (113) Lan C, Das D, Wloskowicz A, Vollrath B. Endothelin-1 modulates hemoglobin-mediated signaling in cerebrovascular smooth muscle via RhoA/Rho kinase and protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004 January;286(1):H165-H173.
- (114) Lan HY, Mu W, Tomita N et al. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model. *J Am Soc Nephrol* 2003 June;14(6):1535-48.
- (115) Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res* 1999 April 10;248(1):44-57.
- (116) Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004 May;18(7):816-27.
- (117) Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 2003 April 11;278(15):13008-15.
- (118) Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten DP. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 2005 February 15;65(3):599-608.

- (119) Lecoin L, Sakurai T, Ngo MT, Abe Y, Yanagisawa M, Le Douarin NM. Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 March 17;95(6):3024-9.
- (120) Lee ME, Bloch KD, Clifford JA, Quertermous T. Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence. *J Biol Chem* 1990 June 25;265(18):10446-50.
- (121) Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC, Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991 October 3;325(14):997-1001.
- (122) Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Johnson R, Lan HY. Role of TGF-beta signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. *Kidney Int* 2003 June;63(6):2010-9.
- (123) Li JH, Huang XR, Zhu HJ et al. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *FASEB J* 2004 January;18(1):176-8.
- (124) Li JH, Zhu HJ, Huang XR, Lai KN, Johnson RJ, Lan HY. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol* 2002 June;13(6):1464-72.
- (125) Li L, Fink GD, Watts SW et al. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 2003 February 25;107(7):1053-8.
- (126) Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol* 2002 November;86(1):5-18.
- (127) Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:89-118.
- (128) Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002 March 5;105(9):1135-43.
- (129) Lin HY, Kaji EH, Winkel GK, Ives HE, Lodish HF. Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 April 15;88(8):3185-9.
- (130) Lonn E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2002 September;4(5):363-72.
- (131) Lonn E, Yusuf S, Dzavik V et al. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation* 2001 February 20;103(7):919-25.
- (132) Lopez FA, Riesco A, Espinosa G et al. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 1993 September;88(3):1166-71.
- (133) Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000 November 7;102(19):2434-40.
- (134) Lutgens E, Gijbels M, Smook M et al. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 June 1;22(6):975-82.

- (135) Lutz M, Krieglstein K, Schmitt S et al. Nerve growth factor mediates activation of the Smad pathway in PC12 cells. *Eur J Biochem* 2004 March;271(5):920-31.
- (136) Macarthur H, Warner TD, Wood EG, Corder R, Vane JR. Endothelin-1 release from endothelial cells in culture is elevated both acutely and chronically by short periods of mechanical stretch. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 April 15;200(1):395-400.
- (137) Maeda S, Miyauchi T, Sakai S et al. Prolonged exercise causes an increase in endothelin-1 production in the heart in rats. *Am J Physiol* 1998 December;275(6 Pt 2):H2105-H2112.
- (138) Maguire JJ, Johnson CM, Mockridge JW, Davenport AP. Endothelin converting enzyme (ECE) activity in human vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1997 December;122(8):1647-54.
- (139) Maki S, Miyauchi T, Sakai S et al. Endothelin-1 expression in hearts of transgenic hypertensive mice overexpressing angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31 Suppl 1:S412-S416.
- (140) Malek A, Izumo S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol* 1992 August;263(2 Pt 1):C389-C396.
- (141) Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 2001 November 9;89(10):930-4.
- (142) Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet* 1999 October 30;354(9189):1493-8.
- (143) Marini M, Carpi S, Bellini A, Patalano F, Mattoli S. Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 March 27;220(3):896-9.
- (144) Masaki T. The discovery of endothelins. *Cardiovasc Res* 1998 September;39(3):530-3.
- (145) Maschio G, Alberti D, Janin G et al. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med* 1996 April 11;334(15):939-45.
- (146) Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000 March 15;14(6):627-44.
- (147) Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005 December 1;19(23):2783-810.
- (148) Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000 April 17;19(8):1745-54.
- (149) Matsumura Y, Hashimoto N, Taira S et al. Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in the pathogenesis of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *Hypertension* 1999 February;33(2):759-65.
- (150) Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension* 1998 July;32(1):89-95.

- (151) McCaffrey TA, Consigli S, Du B et al. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. *J Clin Invest* 1995 December;96(6):2667-75.
- (152) McCaffrey TA, Du B, Consigli S et al. Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest* 1997 November 1;100(9):2182-8.
- (153) McCaffrey TA, Du B, Fu C et al. The expression of TGF-beta receptors in human atherosclerosis: evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J Mol Cell Cardiol* 1999 September;31(9):1627-42.
- (154) McKenna CJ, Burke SE, Opgenorth TJ et al. Selective ET(A) receptor antagonism reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model. *Circulation* 1998 June 30;97(25):2551-6.
- (155) Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001 September;38(3 Pt 2):635-8.
- (156) Minamino T, Kurihara H, Takahashi M et al. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation* 1997 January 7;95(1):221-30.
- (157) Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hu RM, Prins BA, Levin ER. Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochem J* 1998 March 15;330 (Pt 3):1097-105.
- (158) Mori T, Kawara S, Shinozaki M et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999 October;181(1):153-9.
- (159) Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Role of AP-1 complex in angiotensin II-mediated transforming growth factor-beta expression and growth of smooth muscle cells: using decoy approach against AP-1 binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 February 13;243(2):361-7.
- (160) Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 2002 June 3;82(1-2):85-91.
- (161) Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000 March;11(1-2):59-69.
- (162) Nabah YN, Mateo T, Estelles R et al. Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines. *Circulation* 2004 December 7;110(23):3581-6.
- (163) Nahmias C, Strosberg AD. The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 1995 July;16(7):223-5.
- (164) Naito T, Masaki T, Nikolic-Paterson DJ, Tanji C, Yorioka N, Kohno N. Angiotensin II induces thrombospondin-1 production in human mesangial cells via p38 MAPK and JNK: a mechanism for activation of latent TGF-beta1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 February;286(2):F278-F287.

- (165) Nakamura T, Ebihara I, Fukui M et al. Renal expression of mRNAs for endothelin-1, endothelin-3 and endothelin receptors in NZB/W F1 mice. *Ren Physiol Biochem* 1993 September;16(5):233-43.
- (166) Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol* 1997 August 15;159(4):1987-92.
- (167) Nakao A, Okumura K, Ogawa H. Smad7: a new key player in TGF-beta-associated disease. *Trends Mol Med* 2002 August;8(8):361-3.
- (168) Naomi S, Iwaoka T, Disashi T et al. Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Circulation* 1998 January 27;97(3):234-6.
- (169) Natarajan R, Scott S, Bai W, Yerneni KK, Nadler J. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. *Hypertension* 1999 January;33(1 Pt 2):378-84.
- (170) Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 2006 April 5;295(13):1556-65.
- (171) Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004 March 3;291(9):1071-80.
- (172) O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK et al. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy. *Circ Res* 1993 August;73(2):223-31.
- (173) O'Brien RF, Robbins RJ, McMurtry IF. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol* 1987 August;132(2):263-70.
- (174) Oemar BS, Werner A, Garnier JM et al. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* 1997 February 18;95(4):831-9.
- (175) Ohwaki T, Sakai H, Hirata Y. Endothelin-converting enzyme activity in human serum lipoprotein fraction. *FEBS Lett* 1993 April 5;320(2):165-8.
- (176) Orzechowski HD, Gunther A, Menzel S et al. Endothelial expression of endothelin-converting enzyme-1 beta mRNA is regulated by the transcription factor Ets-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31 Suppl 1:S55-S57.
- (177) Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 1997 November;30(5):1238-46.
- (178) Park SK, Kim J, Seomun Y et al. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 June 22;284(4):966-71.
- (179) Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin ER. Astrocyte progression from G1 to S phase of the cell cycle depends upon multiple protein interaction. *J Biol Chem* 1998 May 29;273(22):13966-72.
- (180) Peifley KA, Winkles JA. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 January 6;242(1):202-8.

- (181) Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 2004 January 3;363(9402):62-4.
- (182) Piqueras L, Kubes P, Alvarez A et al. Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation* 2000 October 24;102(17):2118-23.
- (183) Porreca E, Di FC, Baccante G, Di NM, Cuccurullo F. Increased transforming growth factor-beta(1) circulating levels and production in human monocytes after 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase inhibition with pravastatin. *J Am Coll Cardiol* 2002 June 5;39(11):1752-7.
- (184) Rajagopalan S, Brook R, Mehta RH, Supiano M, Pitt B. Effect of losartan in aging-related endothelial impairment. *Am J Cardiol* 2002 March 1;89(5):562-6.
- (185) Rich S, McLaughlin VV. Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation* 2003 November 4;108(18):2184-90.
- (186) Rizvi MA, Katwa L, Spadone DP, Myers PR. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1996 February;28(2):243-52.
- (187) Roberts AB. TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect* 1999 December;1(15):1265-73.
- (188) Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 2003 November;112(9):1342-50.
- (189) Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 1996 July;24(1):233-40.
- (190) Rodriguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Lamas S. Functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1 regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression. *Circ Res* 2003 June 27;92(12):1288-95.
- (191) Rosei EA, Rizzoni D, Muiesan ML et al. Effects of candesartan cilexetil and enalapril on inflammatory markers of atherosclerosis in hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Hypertens* 2005 February;23(2):435-44.
- (192) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 January 14;340(2):115-26.
- (193) Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995;57:791-804.
- (194) Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973 June 29;180(93):1332-9.
- (195) Rossi GP, Albertin G, Neri G et al. Endothelin-1 stimulates steroid secretion of human adrenocortical cells ex vivo via both ETA and ETB receptor subtypes. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 October;82(10):3445-9.
- (196) Rossi GP, Colonna S, Pavan E et al. Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries ex vivo. *Circulation* 1999 March 9;99(9):1147-55.

- (197) Ruiz-Opazo N, Hirayama K, Akimoto K, Herrera VL. Molecular characterization of a dual endothelin-1/Angiotensin II receptor. *Mol Med* 1998 February;4(2):96-108.
- (198) Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Blanco J, Egido J. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am J Pathol* 2001 May;158(5):1743-56.
- (199) Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* 2001 December 1;38(6):1382-7.
- (200) Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res* 2000 June 23;86(12):1266-72.
- (201) Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 2007 May 1;74(2):196-206.
- (202) Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep* 2003 February;5(1):73-9.
- (203) Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation* 2003 September 23;108(12):1499-505.
- (204) Ryan ST, Kotliansky VE, Gotwals PJ, Lindner V. Transforming growth factor-beta-dependent events in vascular remodeling following arterial injury. *J Vasc Res* 2003 January;40(1):37-46.
- (205) Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem* 1989 September 5;264(25):14613-6.
- (206) Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takawa Y, Yanagisawa H, Masaki T. Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 July 31;178(2):656-63.
- (207) Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990 December 20;348(6303):732-5.
- (208) Sanchez-Capelo A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005 February;16(1):15-34.
- (209) Sata M, Saiura A, Kunisato A et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002 April;8(4):403-9.
- (210) Schalkwijk CG, Smulders RA, Lambert J, Donker AJ, Stehouwer CD. ACE-inhibition modulates some endothelial functions in healthy subjects and in normotensive type 1 diabetic patients. *Eur J Clin Invest* 2000 October;30(10):853-60.
- (211) Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D et al. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 2000 March 28;101(12):1372-8.
- (212) Schmidt M, Kroger B, Jacob E et al. Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett* 1994 December 19;356(2-3):238-43.

- (213) Schwarting A, Schlaak J, Lotz J, Pfers I, Meyer zum Buschenfelde KH, Mayet WJ. Endothelin-1 modulates the expression of adhesion molecules on fibroblast-like synovial cells (FLS). *Scand J Rheumatol* 1996;25(4):246-56.
- (214) Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995 September;77(3):445-65.
- (215) Schwartz SM, Murry CE. Proliferation and the monoclonal origins of atherosclerotic lesions. *Annu Rev Med* 1998;49:437-60.
- (216) Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2000 September;2(5):422-9.
- (217) Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P et al. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* 1997 December 15;328 (Pt 3):871-7.
- (218) Scott NA, Cipolla GD, Ross CE et al. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 1996 June 15;93(12):2178-87.
- (219) Seki T, Hong KH, Oh SP. Nonoverlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. *Lab Invest* 2006 February;86(2):116-29.
- (220) Seko T, Ito M, Kureishi Y et al. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res* 2003 March 7;92(4):411-8.
- (221) Serruys PW, de JP, Kiemeneij F et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* 1994 August 25;331(8):489-95.
- (222) Sessa WC, Kaw S, Hecker M, Vane JR. The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 January 31;174(2):613-8.
- (223) Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K et al. Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 February 15;207(2):807-12.
- (224) Sleight P, Yusuf S. New evidence on the importance of the renin-angiotensin system in the treatment of higher-risk patients with hypertension. *J Hypertens* 2003 September;21(9):1599-608.
- (225) Smith JD, Bryant SR, Couper LL et al. Soluble transforming growth factor-beta type II receptor inhibits negative remodeling, fibroblast transdifferentiation, and intimal lesion formation but not endothelial growth. *Circ Res* 1999 May 28;84(10):1212-22.
- (226) Song CY, Kim BC, Hong HK, Lee HS. Oxidized LDL activates PAI-1 transcription through autocrine activation of TGF-beta signaling in mesangial cells. *Kidney Int* 2005 May;67(5):1743-52.
- (227) Stewart DJ, Cernacek P, Mohamed F, Blais D, Cianflone K, Monge JC. Role of cyclic nucleotides in the regulation of endothelin-1 production by human endothelial cells. *Am J Physiol* 1994 March;266(3 Pt 2):H944-H951.

- (228) Suzuki E, Nagata D, Kakoki M et al. Molecular mechanisms of endothelin-1-induced cell-cycle progression: involvement of extracellular signal-regulated kinase, protein kinase C, and phosphatidylinositol 3-kinase at distinct points. *Circ Res* 1999 March 19;84(5):611-9.
- (229) Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003 June;35(6):881-900.
- (230) Taylor DS, Cheng X, Pawlowski JE, Wallace AR, Ferrer P, Molloy CJ. Epiregulin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by angiotensin II, endothelin-1, and thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 February 16;96(4):1633-8.
- (231) Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension* 2000 September;36(3):330-6.
- (232) Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994 October 1;344(8927):910-3.
- (233) Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000 December;52(4):639-72.
- (234) Tunon J, Ruiz-Ortega M, Egido J. Regulation of matrix proteins and impact on vascular structure. *Curr Hypertens Rep* 2000 February;2(1):106-13.
- (235) Uchida K, Uchida S, Nitta K, Yumura W, Nihei H. Regulated expression of endothelin converting enzymes in glomerular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1997 April;8(4):580-5.
- (236) Uchida Y, Ninomiya H, Saotome M et al. Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur J Pharmacol* 1988 September 13;154(2):227-8.
- (237) Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G et al. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem* 1999 September;264(2):341-9.
- (238) Valdenaire O, Rohrbacher E, Mattei MG. Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem* 1995 December 15;270(50):29794-8.
- (239) Van AL, Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997 September 15;11(18):2295-322.
- (240) van RN, Hoefer I, Bottinger M et al. Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ Res* 2003 February 7;92(2):218-25.
- (241) Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 2002 February;118(2):211-5.
- (242) Wada A, Tsutamato T, Maeda Y, Kanamori T, Matsuda Y, Kinoshita M. Endogenous atrial natriuretic peptide inhibits endothelin-1 secretion in dogs with severe congestive heart failure. *Am J Physiol* 1996 May;270(5 Pt 2):H1819-H1824.

- (243) Wagner OF, Christ G, Wojta J et al. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992 August 15;267(23):16066-8.
- (244) Wahab NA, Weston BS, Mason RM. Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res* 2005 July 15;307(2):305-14.
- (245) Walden PD, Ittmann M, Monaco ME, Lepor H. Endothelin-1 production and agonist activities in cultured prostate-derived cells: implications for regulation of endothelin bioactivity and bioavailability in prostatic hyperplasia. *Prostate* 1998 March 1;34(4):241-50.
- (246) Wallace JL, Cirino G, De NG, McKnight W, MacNaughton WK. Endothelin has potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach. *Am J Physiol* 1989 April;256(4 Pt 1):G661-G666.
- (247) Wamsley-Davis A, Padda R, Truong LD, Tsao CC, Zhang P, Sheikh-Hamad D. AT1A-mediated activation of kidney JNK1 and SMAD2 in obstructive uropathy: preservation of kidney tissue mass using candesartan. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 September;287(3):F474-F480.
- (248) Wang M, Zhang J, Spinetti G et al. Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *Am J Pathol* 2005 November;167(5):1429-42.
- (249) Wang W, Huang XR, Canlas E et al. Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis. *Circ Res* 2006 April 28;98(8):1032-9.
- (250) Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Haring HU, Schleicher ED. Angiotensin II induces human TGF-beta 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia. *Diabetologia* 2002 June;45(6):890-8.
- (251) Weissberg PL, Witchell C, Davenport AP, Hesketh TR, Metcalfe JC. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1990 December;85(2-3):257-62.
- (252) Wesson DE, Simoni J, Green DF. Reduced extracellular pH increases endothelin-1 secretion by human renal microvascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998 February 1;101(3):578-83.
- (253) Wolf G, Ziyadeh FN, Thaïss F et al. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest* 1997 September 1;100(5):1047-58.
- (254) Wypij DM, Nichols JS, Novak PJ, Stacy DL, Berman J, Wiseman JS. Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochem Pharmacol* 1992 February 18;43(4):845-53.
- (255) Xu D, Emoto N, Giaid A et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994 August 12;78(3):473-85.
- (256) Xu SW, Howat SL, Renzoni EA et al. Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK. *J Biol Chem* 2004 May 28;279(22):23098-103.
- (257) Yamauchi T, Ohnaka K, Takayanagi R, Umeda F, Nawata H. Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 1990 July 2;267(1):16-8.
- (258) Yamboliev IA, Hruby A, Gerthoffer WT. Endothelin-1 activates MAP kinases and c-Jun in pulmonary artery smooth muscle. *Pulm Pharmacol Ther* 1998 April;11(2-3):205-8.

- (259) Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T et al. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 September;85(18):6964-7.
- (260) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988 March 31;332(6163):411-5.
- (261) Yang Z, Krasnici N, Luscher TF. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation* 1999 July 6;100(1):5-8.
- (262) Yang Z, Krasnici N, Luscher TF. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation* 1999 July 6;100(1):5-8.
- (263) Ye S, Dhillon S, Seear R et al. Epistatic interaction between variations in the angiotensin I converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor genes in relation to extent of coronary atherosclerosis. *Heart* 2003 October;89(10):1195-9.
- (264) Yoshioka S, Fujiwara H, Yamada S et al. Endothelin-converting enzyme-1 is expressed on human ovarian follicles and corpora lutea of menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 November;83(11):3943-50.
- (265) Yoshisue H, Suzuki K, Kawabata A et al. Large scale isolation of non-uniform shear stress-responsive genes from cultured human endothelial cells through the preparation of a subtracted cDNA library. *Atherosclerosis* 2002 June;162(2):323-34.
- (266) Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000 January 20;342(3):145-53.
- (267) Zacchigna L, Vecchione C, Notte A et al. Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell* 2006 March 10;124(5):929-42.
- (268) Zegarska J, Paczek L, Pawlowska M et al. Increased mRNA expression of transforming growth factor beta in the arterial wall of chronically rejected renal allografts in humans. *Transplant Proc* 2006 January;38(1):115-8.
- (269) Zeiher AM, Ihling C, Pistorius K, Schachinger V, Schaefer HE. Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. *Lancet* 1994 November 19;344(8934):1405-6.

ANEXO

ANEXO

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados parcialmente en:

Artículos originales:

- **Rodríguez-Vita J**, Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Sanchez-Lopez E, Plaza JJ, Egido J: Endothelin-1, via ET_A receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 97:125-134, 2005.
- **Rodríguez-Vita J**, Sanchez-Lopez E, Esteban V, Ruperez M, Egido J, Ruiz-Ortega M: Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation* 111:2509-2517, 2005.
- Rupérez M, Rodrigues-Diez R, Blanco-Colio LM, Sanchez-López E, **Rodríguez-Vita J**, Esteban V, Carvajal G, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. HMG-CoA Reductase Inhibitors decrease Angiotensin II-Induced vascular fibrosis. The role of RhoA/ROCK and MAPK pathways. En prensa en Hypertension.

Revisiones:

- Ruiz-Ortega M, **Rodríguez-Vita J**, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2007 May 1;74(2):196-206.
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Ruperez M, Sanchez-Lopez E, **Rodríguez-Vita J**, Carvajal G, Egido J: Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 15:159-166, 2006.
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, **Rodríguez-Vita J**, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J: Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol.Dial.Transplant.* 21:16-20, 2006.
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Ruperez M, Sanchez-Lopez E, López A.F, **Rodríguez-Vita J**, Egido J. "Angiotensina II: auténtica citoquina en el daño vascular". *Nefrología* 24:26, 2004.

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:

- Esteban V, Ruperez M, Sanchez-Lopez E, **Rodríguez-Vita J**, Lorenzo O, Demaegdt H, Vanderheyden P, Egido J, Ruiz-Ortega M: Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 96:965-973, 2005.
- Esteban V, Ruperez M, **Vita JR**, Lopez ES, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M: Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NFkappaB pathway and renal inflammatory response. *Kidney Int.Suppl*S33-S38, 2003.

Premios:

- Premio de Investigación en Nefrología Hospal 2003 de la Sociedad Española de Nefrología por el trabajo titulado “El factor de crecimiento conectivo tisular es un mediador de la fibrosis causada por la Angiotensina II.” Mónica Rupérez, Vanesa Esteban, Luis Blanco-Colio, Óscar Lorenzo, Elsa Sánchez-López, **Juan Rodríguez-Vita**, Andrés López-Gerena, Marta Ruiz-Ortega.

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentados en las siguientes reuniones científicas:

- **J. Rodríguez-Vita**, E. Sanchez-López, V. Esteban, M. Rupérez, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. Angiotensin II Activates The Smad Pathway In Vascular Smooth Muscle Cells by a TGF- β independently mechanisms. **Oral communication**. Young Meeting Investigador. Malmö, Sweden. 2005.
- **J. Rodríguez-Vita**, M. Ruiz-Ortega, M. Rupérez, V. Esteban, E. Sanchez-López, JJ.Plaza MD, J. Egido. Endothelin-1, via ET_A Receptor and independently of TGF β , increases the Connective Tissue Growth Factor in Vascular Smooth Muscle Cells. **Poster communication**. Young Meeting Investigador. Malmö, Sweden. 2005.
- Ruperez M, Blanco-Colio LM, **Rodríguez-Vita J**, Sanchez-Lopez E, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. HMG-CoA reductase inhibitors, via Rho proteins, decrease angiotensin II-induced connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. **Poster presentation**. EAS Meeting. Praga. 2005.
- **J. Rodríguez-Vita**, M. Rupérez, V. Esteban, E. Sanchez-López, A.F. López, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. Endothelin-1, via Rho Proteins, increases the Connective Tissue Growth Factor in Vascular Smooth Muscle Cells. **Oral communication**. Meeting of the AHA. Nueva Orleans. 2004.

- **J. Rodríguez-Vita**, E. Sanchez-López, M. Rupérez, V. Esteban, A.F. Lopez, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. Ang II Activates the Smad Signaling Pathway: Potential Role in Vascular Fibrosis. **Poster presentation**. Meeting of the AHA. Nueva Orleans. 2004.
- **J. Rodríguez-Vita**, E. Sanchez-López, M. Rupérez, V. Esteban, A.F. Lopez, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. Smad proteins as intracellular mediators of AngII-induced fibrosis. **Poster presentation**. Gordon Conference. Ventura, California. Febrero. 2004.
- M. Rupérez, L. Blanco-Colio, E. Sánchez-López, V. Esteban, **J. Rodríguez-Vita**, A. López, J. Egido and M. Ruiz-Ortega. HMG-CoA Reductase Inhibitors Decrease Angiotensin II-Induced Connective Tissue Growth Factor In Vascular Smooth Muscle Cells. The role of RhoA/Rho-kinase pathway. **Poster presentation**. Gordon conference. Ventura, California. Febrero. 2004.
- **J. Rodríguez-Vita**, E. Sanchez-López, M. Rupérez, V. Esteban, A.F. Lopez, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. Angiotensin II activates the Smad signalling pathway: Role in vascular fibrosis. **Poster presentation**. ESH. París. Junio. 2004.
- **J. Rodríguez-Vita**, E. Sanchez-López, M. Rupérez, V. Esteban, A.F. Lopez, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. Novel mediators of Angiotensin II-induced vascular fibrosis: The Smad signalling proteins. **Oral communication**. Young Investigator Meeting de la ESH. París. Junio 2004.
- M. Rupérez, L. Blanco-Colio, E. Sánchez-López, V. Esteban, **J. Rodríguez-Vita**, A. López, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. The role of RHO/RHO-kinase pathway. **Poster presentation**. ESH. París. Junio 2004.
- **J. Rodríguez-Vita**, M. Rupérez, V. Esteban, E. Sanchez-López, A.F. López, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. La endotelina participa en la fibrosis vascular mediante la producción del factor de crecimiento conectivo tisular. Papel de las proteínas Rho y el estrés oxidativo. **Poster presentation**. Congreso de las enfermedades vasculares de Madrid. 2004.
- **J. Rodríguez-Vita**, E. Sanchez-López, M. Rupérez, V. Esteban, A.F. Lopez, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. Descripción de un nuevo mecanismo de señalización intracelular implicado en la fibrosis vascular causada por la angiotensina II: las proteínas Smad. **Poster presentation**. Congreso de las enfermedades vasculares de Madrid. 2004.

- **J. Rodriguez-Vita**, M. Rupérez, V. Esteban, E. Sanchez-López, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. Endothelin-1 increases the expression of the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. New insights into the molecular mechanisms of vascular fibrosis. **Poster presentation**. ESH. Milán 2003.
- **J. Rodriguez-Vita**, M. Rupérez, V. Esteban, E. Sanchez-López, J. Egido, M. Ruiz-Ortega. Vasoactives peptides, angiotensin II and endothelin-1 regulates the novel profibrotic factor connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. **Oral communication**. Young Investigator Meeting de la ESH. Milán. 2003.